

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 2. Einleitung | 5 |
| 2.1. Theoretische Grundlagen | 5 |
| 2.1.1. Anatomie und Physiologie der Hypophyse | 5 |
| 2.1.2. Das hypothalamo–adenohypophysäre System | 6 |
| 2.1.3. Das hypothalamo–neurohypophysäre System | 6 |
| 2.1.4. Tumorätiologie | 6 |
| 2.2. Arbeitsansatz | 8 |
| 3. Methodik - Materialien und Versuche | 10 |
| 3.1. Chemikalien, Proteine und Puffer | 10 |
| 3.2. Versuchsanordnungen | |
| 3.2.1. Tumorextraktion | 10 |
| 3.2.2. Gelfiltrationschromatographie | 11 |
| 3.2.3. Zellkultur | 11 |
| 3.2.4. Bioassay mit Tumorfractionen | 11 |
| 3.2.5. Festphasenchromatographie/ Sep-Pak-Trennung | 12 |
| 3.2.6. Vakuumzentrifugation | 13 |
| 3.3. Hormonmessungen | |
| 3.3.1. Rat-GH-Radioimmunoassay (rGH-RIA) | 13 |
| 3.3.2. Rat-Prolactin-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (rPRL-Elisa) | 14 |
| 3.4. Proteinmessung | |
| 3.4.1. Quantitative Proteinbestimmungen mittels Bradford-Assay | 14 |
| 3.5. Statistik | 15 |
| 4. Ergebnisse | |
| 4.1.1. Ermitteln der maximalen Bindungskapazität der Sep-Pak-Kartusche für Albumin | 16 |
| 4.2. Bradford-Messungen | |
| 4.2.1. Beeinflussung des Bradford-Assay durch den Acetonitrilgehalt der | 17 |

| | |
|---|----|
| Fraktionen | |
| 4.2.2. Entfernung von Acetonitril durch Vakuumzentrifugieren | 18 |
| 4.2.3. Vergleich der Absorptionen von Albumin-Acetonitrilgemischen mit und ohne Vakuumzentrifugieren | 19 |
| 4.2.4. Absorptionen von Insulin- und Cytochrom C-Acetonitrilgemischen nach Vakuumzentrifugieren | 20 |
| 4.2.5. Wiederholen der Bradfordmessung für die Fraktionen aus der Sep-Pak-Trennung 4.1.1. nach Vakuumzentrifugieren und Wiederauflösen in PBS | 20 |
| 4.3. Sep-Pak-Trennungen | |
| 4.3.1. Verteilung proteinpositiver Fraktionen bei Sep-Pak-Trennungen von Albumin, Insulin, Cytochrom C und proteinfreier Lösung | 22 |
| 4.3.2. Wiederholbarkeit der Sep-Pak-Trennung auf einer Sep-Pak-Kartusche | 23 |
| 4.3.3. Einfluss des Waschpuffervolumens auf die Proteinverteilung der Sep-Pak-Fraktionen | 23 |
| 4.3.4. Sättigen der Sep-Pak-Kartusche mit verschiedenen Albuminmengen und PBS als Standard (I) | 24 |
| 4.3.5. Ermitteln der optimalen Albuminmenge zum Sättigen der Sep-Pak-Kartusche | 25 |
| 4.3.6. Sättigen der Sep-Pak-Kartusche mit verschiedenen Albuminmengen und PBS als Standard (II) | 26 |
| 4.3.7. Wiederfindungsraten von Albumin auf ungesättigten Kartuschen | 27 |
| 4.3.8. Wiederfindungsraten von Albumin auf gesättigten und ungesättigten Kartuschen | 27 |
| 4.3.9. Wiederfindungsraten von Insulin, Cytochrom C und Albumin auf gesättigten und ungesättigten Kartuschen | 28 |
| 4.3.10. Sep-Pak-Trennung eines Proteingemisches von Albumin und Insulin | 30 |
| 4.3.11. Sep-Pak-Trennung von Prolaktin | 31 |
| 4.3.12.13 Sep-Pak-Trennungen von Albumin zur Berechnung der Interassayvarianz der Sep-Pak-Trennungen | 31 |
| 4.4. Sep-Pak-Trennungen und Zellversuche | |
| 4.4.1. Negativkontrollen | |
| 4.4.1.1. ³ H-Thymidininkorporation von Sep-Pak-Fraktionen von TFA 0,1% | 33 |
| 4.4.1.2. GH-Sekretion von Sep-Pak-Fraktionen von TFA 0,1% | 33 |

| | |
|---|----|
| 4.4.2. Sephadex-Fractionen | |
| 4.4.2.1. Tumor 21C, Sephadex-Fraktion 10 und Tumor 23A Sephadex-Fraktion 10 | 34 |
| 4.4.2.2. Tumor 12, Sephadex-Fractionen 7, 9 und 10 | 35 |
| 4.4.2.3. Tumor 13, Sephadex-Fractionen 12, 13 und 15 | 38 |
| 4.4.2.4. Tumor 14, Sephadex-Fraktion 11 | 41 |
| | |
| 5. Diskussion | |
| 5.1. Bradford-Assay | 42 |
| 5.2. Sep-Pak-Trennung | 43 |
| 5.3. Zellversuche | 44 |
| | |
| 6. Zusammenfassung | 45 |
| | |
| 7. Literatur | 46 |
| | |
| Danksagung | 50 |
| Lebenslauf | 51 |

1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| ALB | Albumin |
| AN | Acetonitril |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C-DM/ F12 | complete DM/F12 |
| DMEM/F12 | Dulbecco´s Modified Eagle´s Serum und F-12-Serum 1:1 |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| Elisa | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| F 1, 2.....10 | Fraktion 1, 2.....10 |
| Fa. | Firma |
| GH | Growth Hormon, Wachstumshormon, Somatotropes Hormon |
| GH3-Zellen | Tumorzelllinie aus Rattenhypophysen |
| MW | Mittelwert |
| N | Negativkontrolle |
| P | Positivkontrolle |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PRL | Prolactin |
| rGH | Ratten-Wachstumshormon |
| RIA | Radioimmunoassay |
| rPRL | Ratten-Prolaktin |
| SD | Standardabweichung |
| TFA | Trifluoressigsäure |

2. Einleitung

Hypophysenadenome sind benigne Tumoren, deren Genese Gegenstand aktueller Forschungen ist. Diskutiert und untersucht werden genetische Aberrationen, hormonelle Einflüsse sowie Veränderungen des lokalen Milieus.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Sep-Pak-Trennung als Festphasenchromatographie auf ihre Eignung zur Fraktionierung von Tumorhomogenisaten sowie der Einsatz der Fraktionen im Bio-Assay zur Detektion intratumoraler stimulierender Faktoren geprüft worden.

2.1. Theoretische Grundlagen

2.1.1. Anatomie und Physiologie der Hypophyse

Die Hypophyse liegt eingebettet in der Sella turcica des Keilbeins (Os sphenoidale) und steht über den Hypophysenstiel mit den vorderen und mittleren Hypothalamuskernen in Verbindung. Überspannt wird die Sella turcica vom Diaphragma sellae. Auf diesem und vor dem Infundibulum liegt das Chiasma opticum. Lateral der Hypophyse verlaufen jeweils die Arteria carotis interna und der Sinus cavernosus. Der Hypophysenstiel grenzt oben an den Recessus infundibuli des 3. Ventrikels. Die ca. 1g schwere, bohngroße Drüse setzt sich zusammen aus einem Vorderlappen, der Adenohypophyse, und einem Hinterlappen, der Neurohypophyse, die sich entwicklungsgeschichtlich, histologisch und funktionell unterscheiden (1).

Tabelle 1: Grundlegende Differenzierung von Adeno- und Neurohypophyse (2)

| Kriterien | Adenohypophyse | Neurohypophyse |
|----------------------------------|---|--|
| entwicklungsgeschichtlich | ektodermale Aussackung der primären Mundhöhle (Rathke Tasche) | aus dem Boden des Diencephalons |
| zytologisch | zu Strängen geordnete epitheloide Zellen, eingehüllt in retikuläre Fasern und eine Basallamina; weitlumiges Kapillarnetz zwischen dem Drüsenparenchym; acidophile (α), basophile (β) und chromophobe (γ) Zellen | marklose Axone neurosekretorischer Zellen des Hypothalamus, umhüllt von Pituizyten |
| funktionell | Hormonproduktion, -speicherung und -freisetzung | Hormonspeicherung und -freisetzung |

Aufgrund der in Tabelle 1 dargestellten Unterschiede ist es möglich, von zwei differenten endokrinen Regelkreisen, dem hypothalamo-adenohypophysären und dem hypothalamo-neurohypophysären System zu sprechen.

2.1.2. Das hypothalamo-adenohypophysäre System

Nach Stimulation durch den Hypothalamus setzt die Adenohypophyse zwei funktionell unterschiedliche Arten von Hormonen frei:

- glandotrope Hormone (adrenokorticotropes Hormon (ACTH), thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH), follikel-stimulierendes Hormon (FSH), luteinisierendes Hormon (LH)), die in bestimmten peripheren Drüsen des Organismus hormonbildend wirken und
- Effektorhormone (GH, Prolaktin), die unmittelbar Einfluss auf Wachstum, geschlechtliche Reifung und Entwicklung, Stoffwechsel oder Reproduktion ausüben.

Die Steuerung durch den Hypothalamus erfolgt über Releasing Hormone zur gesteigerten Ausschüttung und durch Inhibiting Hormone zur Sekretionshemmung. Ein komplexer Regelkreis entsteht dadurch, dass der Hypothalamus durch die Blutkonzentration der Effektorhormone einschließlich der Hormone der peripheren Drüsen eine Rückkopplung erhält. Nerval verarbeitete Umwelteinflüsse und diese Chemotaxis bedingen wiederum die Höhe der Freisetzung der Hypothalamushormone.

2.1.3. Das hypothalamo–neurohypophysäre System

Die Bildung der Hormone des Hypophysenhinterlappens erfolgt in den Nervenzellen des Nucleus paraventricularis und des Nucleus supraopticus des Hypothalamus, von wo sie über die Nervenbahnen des Tractus supraopticohypophyseus in die im Vergleich zur Adenohypophyse deutlich kleinere Neurohypophyse transportiert werden (1). Hier werden sie gespeichert und im Bedarfsfall in den Blutkreislauf abgegeben. Die Regelung der Sekretion von Oxytocin erfolgt über nervale Reizungen, wogegen die Adiuretinausschüttung durch Osmorezeptoren gesteuert wird. Wie einige Hormone des Hypophysenvorderlappens (Prolaktin und humanes Wachstumshormon) wirken die beiden Neurohypophysenhormone unmittelbar auf die Zielorgane. Die Oxytocinausschüttung bewirkt eine Kontraktion des Myometriums sowie des Myoepithels der Brustdrüsen und ist so in reproduktive Prozesse eingebunden. Die vermehrte Sekretion von Adiuretin (ADH), das auch als Vasopressin bezeichnet wird, führt zur Steigerung der Wasserrückresorption in der Niere und hat somit eine Funktion in der Stoffwechselregulation.

2.1.4. Tumorätiologie

Hypophysenadenome des Menschen sind relativ seltene Tumoren, der Anteil an den intrakraniellen Tumoren liegt bei 10-15% bei einer Gesamtinzidenz an intrakraniellen Tumoren von 30 - 40 pro Million Einwohner/ Jahr. Klinisch manifeste Hypophysenadenome treten somit

mit einer Inzidenz von 1 - 8 auf 100000 auf, betroffen sind vor allem 20jährige (3). In unselektierten Autopsiestudien findet sich jedoch eine deutliche höhere Inzidenz von 10 - 27% je nach Autor (4; 5).

Es handelt sich um benigne Tumoren, deren klinische Bedeutung einerseits in den Folgen ihres lokal verdrängenden Wachstums mit nachfolgender sekundärer Insuffizienz primär nicht erkrankter Anteile der Hypophyse als auch von Umgebungsstrukturen, z.B. der Sehbahn, zu sehen ist. Andererseits sezerniert ein Teil der Adenome unkontrolliert Hypophysenhormone mit entsprechender pathologischer Ausschüttung von nachgeschalteten Effektorhormonen und gestörten Regelkreisen mit klinischer Manifestation.

Hypophysenadenome können entweder sporadisch auftreten oder im Rahmen einer multiplen neuroendokrinen Neoplasie.

Die genaue Ätiologie von Hypophysenadenomen ist bisher zum größten Teil unklar. Prinzipiell wird von einem mehrschrittigen Prozess ausgegangen, bei dem zuerst analog zu anderen Tumoren wie z.B. des Kolons, eine erste Mutation und Transformation auftritt, der weitere Veränderungen wie klonale Expansion, Neovaskularisation und Invasion folgen (6; 7).

Es existieren zwei kausalpathogenetische Konzepte: die Theorie einer primären hypothalamischen Dysregulation mit exzessiver hormoneller Stimulation oder fehlender Inhibition führt über eine noduläre Hyperplasie zur Adenomentstehung (6; 8). Bei Frauen mit östrogenhaltiger Antikonzeptivaeinnahme findet sich eine sieben- bis achtfach erhöhte Inzidenz an Prolaktinomen, erklärt durch östrogenstimuliertes Wachstum lactotroper Zellen (9). Weiterhin konnte durch Östrogengabe in östrogensensitiven Fischer-344-Ratten die Entstehung von Prolaktinomen induziert werden. Erfolgt eine Überexpression von Somatoliberin (GHRH), Corticotropin Releasing Hormon (CRH), Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) und Gonadoliberin (GnRH), resultiert daraus eine Hyperplasie endokriner Zielzellen bis hin zur Ausbildung einer Neoplasie. Dopamin ist ein Inhibitor der Prolaktinsekretion. In Knockout-Mäusen war bei Dopaminresistenz lactotroper Zellen eine Hyperplasie und Tumorentstehung zu beobachten (6; 8; 10; 11). Die inhibitorische Wirkung von Dopamin wird auch therapeutisch bei Prolaktinomen genutzt. Dopaminagonisten führen insbesondere bei Mikroadenomen nicht nur zur Normalisierung des Prolaktinspiegels, sondern auch zur Verkleinerung des Tumolvolumens.

Die alternative Theorie geht von dem Auftreten somatischer Punktmutationen im Bereich eines Onkogens aus. In vielen GH-produzierenden Hypophysenadenomen kann ein intrinsischer hypophysärer Defekt festgestellt werden (8). Weitere Tumoren zeigen veränderte Expressionsmuster von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen im ras-, Rb-, p16-, p27-, p53-

System und Alterationen im Cyclinsystem, welche die Regulation des Zellzyklus steuern und ggfs. die Apoptose einleiten (6; 12; 13; 14; 15).

Häufig finden sich zudem Deletionen der Chromosomen 11 (11q13), 13 (13q 12-14) und 10 (10q26), was die Bedeutung intrinsischer Faktoren bzw. des Verlustes von Tumorsuppressorgenen in der Tumorgenese unterstützt. Die Entstehung monoklonaler Tumorzelllinien durch somatische Mutation von Zellen des Hypophysenvorderlappens ist nach Buchfelder (16) und anderen Autoren wahrscheinlich (17; 18).

Bei Prolaktinomen ist eine Überexpression von Trichohyalin, Transforming growth factor β (TGF- β)-Rezeptor III und Proteaseninhibitor 12 bekannt, zudem liegt eine Funktionsstörung verschiedener Onkogene vor (19). Bei somatotropen Adenomen ist in 40% eine gestörte Somatoliberin-(GHRH)-Signaltransduktion mit Punktmutation des *gsp*-Onkogens und Dauerstimulation der GH-produzierenden Zellen vorhanden (8). Adrenokorticotropes Hormon bildende Adenome (ACTH-Zell-Adenome) lassen pathogenetisch eine verminderte Expression von p27-Tumorsuppressorgen erkennen (20; 21).

Eine ungeklärte Rolle in der Pathogenese von Hypophysenadenomen spielen auto- und parakrin freigesetzte Faktoren. Zahlreiche Wachstumsfaktoren, vasoaktive Substanzen, Neuropeptide und Zytokine wie unter anderem beta Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) (22), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Interleukin 6 (23), Insulin like growth factor 1 (IGF-1), Interferon- γ sowie Transforming growth factor β (TGF- β) (24) werden von den endokrinen und follikulostellaren Zellen der Hypophyse sezerniert. Diese lassen sich sowohl in normalem als auch adenomatösem Hypophysengewebe in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisen und entwickeln sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte auf Zellproliferation, Hormonproduktion und -freisetzung.

Insgesamt besteht somit in der Tumorätiologie von Hypophysenadenomen ein komplexes Zusammenspiel hormoneller, genetischer und lokaler Faktoren, deren Gewichtung und Reihenfolge des Einwirkens im Rahmen der Adenomentstehung nicht geklärt sind.

2.2. Arbeitsansatz

Ein möglicher Ansatz zum Nachweis lokaler para- und autokriner Faktoren ist die Homogenisierung von intraoperativ gewonnenem humanen Adenomgewebe sowie die Inkubation von Adenomzelllinien mit dem Homogenisat mit Bestimmung der biologischen Aktivität.

Eine gut untersuchte Adenomzelllinie ist die GH3-Zelllinie. Diese wurde aus einem radioaktiv induzierten Rattenhypophysentumor einer Wistar-Furth-Ratte 1969 von A. H. Tashjian et al gewonnen. Sie entspricht in der Expression ihrer Rezeptoren für Dopamin, Thyreotropin Releasing Hormon (TRH), Somatostatin, Östradiol, epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und vasoaktivem intestinalen Peptid (VIP) und der daraus folgenden Regulation lactotropen Zellen. Sie sezernieren außer Prolaktin auch Somatotropin und können als Modell für somatotrope Tumoren dienen.

Etabliert ist nach Homogenisierung operativ gewonnener Adenome die Fraktionierung über eine Flüssiggelchromatographie, um nach Molekülgröße aufgeteilte Fraktionen des Tumoreluates zu erhalten, die dann mit den Zelllinien inkubiert werden können. Anwendung findet z.B. die Superdex G30. Je nach Einstellung des Fraktionsvolumens und Laufgeschwindigkeit ist eine unterschiedlich genaue Separation nach Molekülgröße möglich.

Insgesamt ist die Gelchromatographie jedoch durch das Herstellen der Säulen mit Einfüllen des Gels und Äquilibration der Säule erheblich arbeitsaufwändig. Zudem sind die Gelsäulen pflegeaufwändig, ein Trockenlaufen bzw. eindringende Luftblasen im Rahmen der Fraktionierung können zur Zerstörung der Säule und ggfs. sogar zum Verlust von Probenmaterial führen.

Eine Alternative zur Flüssiggelchromatographie stellt die Fest-Phasen-Chromatographie, z.B. mittels Sep-Pak-Kartusche dar. Dieses Verfahren ist seit mehreren Jahren etabliert, um zum Beispiel unerwünschte Beimischungen aus Probenlösungen zu entfernen. Weiterhin lassen sich Probenanreicherungen vornehmen, indem die gelöste Substanz zunächst reversibel an die Kartuschenmatrix aufgrund hydrophober Wechselwirkungen gebunden wird und sich anschließend durch ein geeignetes Lösungsmittel eluieren lässt.

Ziel der Arbeit war es, die Anwendbarkeit der Sep-Pak-Kartusche zur Fraktionierung von Tumorphomogenisaten mit anschließender Verwendung der Fraktionen im Zellversuch nachzuweisen sowie mögliche auftretende Probleme in der Probenaufbereitung sowie Messung von Proteinkonzentrationen zu lösen.

3. Methodik - Materialien und Versuche

3.1. Chemikalien, Proteine und Puffer

Acetonitril: (AN) C₂H₃N

Acetonitril 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80%: (AN 0-80%), Waschpuffer 2-10, die Waschpuffer 2-10 enthalten 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 und 80% Acetonitril in TFA 0,1%

Albumin: Fa. Sigma®, aus Rinderserumalbumin (BSA)

Cytochrom C: Fa. Sigma®, Lot 65H94 38 [9007-43-6], EEC No 232-700-9, aus Pferdeherz

Insulin: Fa. Sigma®, Lot 74H00 845 [11070-73-8], aus Rinderpankreas

Trifluoressigsäure: Trifluoro-acetic-acid 0,1% (TFA 0,1%), C₂HF₃O₂

Phosphatpuffer pH 7,4: (PBS) Natriumchlorid 8,7g, EDTA (Sigma®) 1,0g, Natriumazid 0,2g, 0,5M Phosphatpuffer 100ml, Aqua destillata 900ml, Aufbewahrung bei 8°C

Phosphatpuffer mit Serumalbumin 0,5% pH 7,4: (PBS/ BSA): Natriumchlorid 8,7g, EDTA (Sigma®) 1,0g, Natriumazid 0,2g, 0,5M Phosphatpuffer 100ml, Rinderserumalbumin (BSA) 0,5g, Aqua destillata 900ml, Aufbewahrung bei 8°C

Phosphatpuffer 0,5M

Prolaktin: Pool aus verschiedenen Standards der Konzentration 80; 60 und 40 ng/ml Prolaktin (Ratte) des Prolaktin-Bestimmungskits (Milenia-Rat-PRL-Elisa, Kit-Chg. 109-112, DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD)

3.2. Versuchsanordnungen

3.2.1. Tumorextraktion

Unmittelbar nach operativer Entfernung wurde das Tumorgewebe in PBS verbracht, eisgekühlt ins Labor transportiert und dort mittels flüssigem Stickstoff gefroren. Vor der Extraktion wurde das aufgetaute Gewebe gewogen und mittels Skalpell mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebepartikel durch Zugabe von 3ml gekühlter 0,1M Salzsäure und 20µg/ml Pepstatin A homogenisiert. Das Homogenisat wurde nach einem Ultraschallbad für 20min bei 10000U/min und 4°C für 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar nachfolgend der Gelfiltrationschromatographie zugeführt, nachdem zuvor ein Aliquot zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bradford-Assay entnommen wurde.

3.2.2. Gelfiltrationschromatographie

Eine 65cm x 1,6cm Superdex G30-Säule (Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig, BRD) wurde mit Proteinstandards kalibriert. Die Proteinverteilung lag zwischen 15000kD bis unter 1kD bei einem Elutionsvolumen von 113ml. Die Flussrate von 0,6ml/min wurde durch eine Watson 503U Peristaltikpumpe (Smith & Nephew Watson Marlow, Falmouth, GB) sichergestellt. Als Elutionsflüssigkeit wurde steriles entgastes PBS gewählt. Bis zu 3ml des Tumorüberstandes wurden auf die Säule geladen und insgesamt 30 5ml-Fractionen mittels eines Fraktionssammlers (UKB Ultrorac 7000 Fraction Collector, UKB Stockholm, Schweden) gewonnen. Die Fraktionen wurden von 1-30 fortlaufend gekennzeichnet. Von jeder Fraktion wurden sowohl die UV-Absorption bei 280nm als auch der Proteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt. Die Fraktionen 1-6, die als Negativkontrollen in den Zellversuchen dienten, wurden gepoolt und in 4ml-Aliquote aufgeteilt. Die Fraktionen 7-24 wurden in 0,5, 1 und 1,5ml-Aliquote getrennt. Alle Aliquote wurden anschließend bei Raumtemperatur mittels einer Vakuumzentrifuge (Univapo 100 vacuum concentrator, UniEquip, Martinsried, BRD) eingetrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Diese Aliquote werden nachfolgend als Sephadex-Fractionen bezeichnet.

3.2.3. Zellkultur

Die GH3-Zell-Linie wurde freundlicherweise von Dr. M. Lewis (Cardiff, GB) überlassen. Die Zellkultur erfolgte in DMEM/ F12-Lösung (Gibco, BRD), angereichert mit 15% Pferdeserum, 2,5% Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin, BRD), 100000IE/l Penicillin (Biochrom, Berlin, BRD) und 0,044mg/l Ca_2CL (C-DM/ F12). Das Kulturmedium wurde jeden zweiten bis dritten Tag ersetzt, bis ungefähr 70% des Bodens des Kulturgefäßes von einer Zellschicht bedeckt waren, dann wurden die Zellen in ein neues Kulturgefäß umgesetzt.

Für Bioassays wurden die GH3-Zellen durch Inkubation mit 0,1%iger EDTA-Lösung für 5min bei 37°C in Suspension gebracht. Das EDTA wurde durch Zentrifugation mit 300U/min für 5min bei Raumtemperatur entfernt und die Zellen in frisches Kulturmedium gegeben.

3.2.4. Bioassay mit Tumorfraktionen

^3H -Thymidininkorporation und GH-Sekretion wurden nach Inkubation der GH3-Zellen mit den verschiedenen Proben bestimmt. Die ^3H -Thymidininkorporationen wurden aus einer Multititerplatte mit 96 Vertiefungen sowie die Hormonsekretion aus einer weiteren Multititerplatte bestimmt.

Die GH3-Zellen wurden in C-DM/ F12 mit jeweils 3×10^4 oder 6×10^4 Zellen pro Vertiefung in eine Multititerplatte mit 96 Vertiefungen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Überstände entfernt und die adhärennten Zellen mit 200µl serumfreiem DMEM/ F12 (SF-DM/ F12) gespült, um Serumreste und endogene Wachstumsfaktoren zu entfernen. Tumorfractionen (sowohl Sep-Pak- als auch als Sephadex-Fractionen) wurden in SF-DM/ F12 gelöst und in 3 Replikaten den Zellen zugegeben. Mindestens je 8 Negativkontrollen (SF-DM/ F12) und 8 Positivkontrollen mit 1mM Adenosin waren pro Platte eingeschlossen. Für die Bestimmung der ^3H -Thymidininkorporation wurde zusätzlich in jede Vertiefung $0,5\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin gegeben. Nach weiteren 24h Inkubationsdauer wurden die Überstände und Zellen getrennt.

Für die Gewinnung der Überstände wurden die Multititerplatten bei 300g für 5min zentrifugiert, die Überstände in Aliquoten von 70-80µl in neue Multititerplatten mit 96 Vertiefungen transferiert und bei -20°C bis zur Hormonmessung aufbewahrt.

Zur Bestimmung der ^3H -Thymidininkorporation wurden die Zellen mittels eines halbautomatischen Erntegerätes (Semiautomatic harvester, Wallac, BRD [jetzt Perkin Elmer]) gesammelt, mit dH_2O osmotisch lysiert und die Desoxyribonukleinsäure (DNS) auf Zellulose gebracht. Diese wurde getrocknet, durch einen Plastikumschlag versiegelt und die Aktivität in einem beta-Zähler (Wallac β -counter, Wallac, BRD [jetzt Perkin Elmer]) gemessen.

Positive oder negative Stimulation im Zellversuch wurde definiert als ein Über- bzw. Unterschreiten vom Mittelwert der jeweiligen Negativkontrolle plus bzw. minus der doppelten Standardabweichung.

Tumorextraktion, Gelfiltrationschromatographie, Zellkultur und die Bioassays mit den Tumorfractionen wurden durch Mitarbeiter des Labors durchgeführt.

3.2.5. Festphasenchromatographie

Die Festphasenchromatographie erfolgte auf Sep-Pak-C18Plus-Kartuschen (Waters: WAT020515).

Zunächst wurde die Kartusche mit 5ml Ethanol 100% oder Acetonitril 80% in TFA 0,1% aktiviert und nachfolgend mit 8ml Waschpuffer (TFA 0,1%) gespült. Für Versuche auf gesättigten Kartuschen wurde anschließend 5ml Albuminlösung (Konzentration in den Versuchen angegeben) auf die Kartusche gegeben und nochmals mit 10ml Ethanol 100% und 10ml TFA 0,1% gespült. Anschließend bzw. für Versuche ohne vorheriges Sättigen wurde die in PBS gelöste Probe auf die Kartusche gegeben und das Eluat als Fraktion 1 aufgefangen. Nachfolgend wurde die Kartusche mit den 9 Waschpuffern in ansteigender

Acetonitrilkonzentration von 0-80% gespült und die Eluate getrennt als Fraktionen 2, 3....10 in Polypropylenröhrchen (Fa. Saarstedt) aufgefangen. Die Flußgeschwindigkeiten lagen bei 4-10ml/min. Die Volumina der Proben und der Waschpuffer betragen jeweils gleich 4 oder 5ml. Bei der Trennung von Tumorfraktionen für nachfolgende Zellversuche wurde steril gearbeitet. Ein Aliquot zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde entnommen. Fraktionen für Tumorversuche wurden unmittelbar nachfolgend bei Raumtemperatur mittels einer Vakuumzentrifuge (Univapo 100 vacuum concentrator, UniEquip, Martinsried, BRD) eingetrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Die Fraktionen werden nachfolgend als Sep-Pak-Fraktionen bezeichnet.

3.2.6. Vakuumzentrifugieren

Zur Entfernung des Acetonitril vor der Proteinbestimmung wurden die Sep-Pak-Fraktionen mit einer Vakuumzentrifuge (Univapo 100 vacuum concentrator, UniEquip, Martinsried, BRD) getrocknet. Dazu wurden von den Fraktionen und Standards zwischen 300 und 1000 μl in Polypropylenröhrchen (Fa. Saarstedt) umpipettiert und bis zum vollständigen Verdampfen der Flüssigkeit unter Anlage eines Vakuums bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das Wiederauflösen erfolgte für den Bradford-Assay mit einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge PBS.

3.3. Hormonmessungen

3.3.1. Rat-GH-Radioimmunoassay (rGH-RIA)

Das in den Zellüberstand der Mikrotiterplatten sezernierte rGH wurde mit einem spezifischen RIA gemessen. Die dafür benutzten Standards und Kontrollen wurden freundlicherweise von der National Pituitary Agency, NIDDK (Torrance, California, USA) zur Verfügung gestellt. Der Tracer wurde nach einer modifizierten Chloramin-T-Methode hergestellt (25). Nicht radioaktiv markiertes Wachstumshormon und freies ^{125}Jod wurden vom markierten Wachstumshormon ($^{125}\text{Jod-GH}$) oder Tracer mittels einer G50-Sephadexsäule mit gesättigter Rinder-Serumalbuminlösung getrennt. Nach längerer Lagerung konnte auf dem gleichen Wege eine nochmalige Aufreinigung zur Entfernung zwischenzeitlich freigesetzten $^{125}\text{Jods}$ erfolgen. Die rGH-Standards und -Proben in Duplikaten und rGH-Kontrollen in Quadruplikaten wurden mit dem radioaktiven Tracer und Anti-GH-Antiserum vom Affen für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe eines Anti-Affen-Antikörpers vom Esel (Antibodies Inc., Davis, California, USA) und nochmaliger Inkubation über 4h erfolgte bei 4°C die Zentrifugation für

30min bei 1500g zur Präzipitation der Antikörper-Antikörperkomplexe. Anschließend wurde der Überstand mit dem ungebundenen Tracer dekantiert. Die in umgekehrtem Verhältnis zur GH-Konzentration stehende Radioaktivität der Proben wurde an einem automatisierten 1470Wizard Gamma-Zähler (Wallac Distribution GmbH, Freiburg, BRD) gemessen.

3.3.2. Rat-Prolactin-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (rPRL-Elisa)

Die rPRL-Konzentrationen wurden mit einem kommerziell verfügbaren Elisa entsprechend der Firmeninstruktion gemessen (DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD). Die Standards, Kontrollen und Proben wurden zeitgleich nach Abschluß der Reaktion bei 450nm in einem Platten-UV-Absorptionslesegerät (Dynex MRX plate reader, von DPC Biermann zur Verfügung gestellt) gemessen. Die Auswertung erfolgte automatisiert mit der von der Fa. DPC Biermann freundlicherweise zur Verfügung gestellten Software.

3.4. Proteinmessung

3.4.1. Quantitative Proteinbestimmungen mittels Bradford-Assay

Bei Raumtemperatur wurden 2g Coomassie blue Pulver (Merck GmbH, Darmstadt, BRD) in 100ml Ethanol 100% über 24h in einem geschlossenem lichtgeschützten Gefäß gerührt und durch einen Papierfilter filtriert. Bei 8°C ist diese Stock-Solution in einem verschlossenen lichtgeschützten Gefäß mindestens 12 Monate verwendbar. Für das Bradfordreagenz wurden 8,75ml der Stock-Solution mit 105ml 85%iger Phosphorsäure, 25ml 100%igem Ethanol sowie 861ml Aqua dest. aufgefüllt. Das fertige Reagenz ist bei 8°C 3 Monate lagerbar. Die Standards (0, 3, 6, 13, 25, 50, 100, 200 µg/ml) und die Kontrollen (80µg/ml) aus BSA wurden abgewogen und mit PBS gelöst, dann aliquotiert und bei -20°C bis zum Einsatz gelagert.

Der Bradford-Assay erfolgte in einer Multititerplatte mit 96 Vertiefungen mit glattem Boden. Das Probenvolumen betrug 30µl. Es wurden die Standards 3µg/ml – 200µg/ml und die Kontrollen in 4 Replikaten sowie die Proben in Duplikaten angesetzt. Der Standard 0µg/ml wurde in 8 Replikaten gemessen zur Bestimmung der Assay-Sensivität (Mittelwert des Standards 0µg/ml plus 2 Standardabweichungen). Nachfolgend wurde in jede Vertiefung 150µl der Bradfordreagenz gegeben. Nach 5min Inkubationszeit wurde die Platte 10sec gerüttelt und anschließend zeitgleich bei 650nm in einem Platten-UV-Absorptionslesegerät (Dynex MRX plate reader, von DPC Biermann zur Verfügung gestellt) die Absorptionen gemessen. Die Auswertung erfolgte automatisiert mit der von der Fa. DPC Biermann freundlicherweise zur Verfügung gestellten Software. Proben mit Proteinkonzentrationen, die kleiner oder gleich des

Mittelwertes plus zwei Standardabweichungen des Standards $0\mu\text{g/ml}$ waren, wurden auf den Wert $0\mu\text{g/ml}$ korrigiert.

3.5. Statistik

Alle Daten wurden tabellarisch und / oder grafisch dargestellt.

Weitere Auswertungen, insbesondere der Ergebnisse der Zellversuche, erfolgten mittels Excel 2000. Es erfolgte die Berechnung des Mittelwertes sowie der Standardabweichungen. Bei weniger als vier Einzelwerten wurde keine Bestimmung der Standardabweichung vorgenommen. Gemessene Werte, welche kleiner bzw. größer als der Mittelwert der entsprechenden Negativkontrolle minus bzw. plus der doppelten Standardabweichung ($MW(N) \pm 2 \times SD$) sind, wurden als negativ bzw. positiv angesehen, da normalverteilte Zufallsgrößen durch Angabe von Mittelwert und Standardabweichung vollständig beschrieben werden. Es gilt, dass 95,4 % der Realisierungen im Intervall $MW \pm 2 \times SD$ liegen. Bei Vorliegen von mindestens drei Messwerten pro Variable erfolgte eine weitere statistische Analyse. Bestimmt wurde die Signifikanz der Unterschiede mittels des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test (DataLab-Version 2.599).

P-Werte wurden für die Verteilung der proteinpositiven Fraktionen über die Kontingenztabelle/Vierfeldertafel ermittelt (Statistiklabor V3.7). Es erfolgte die Auswertung gegen die Annahme einer zufälligen Verteilung des Proteins auf 2 der 10 möglichen Fraktionen pro Sep-Pak-Trennungen.

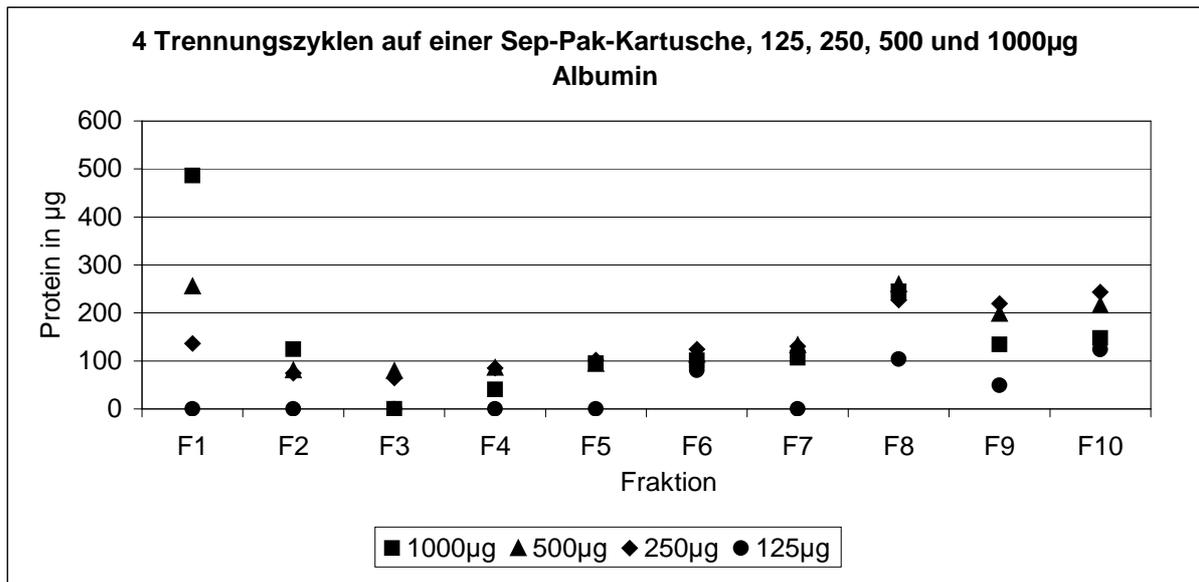
Die anhand der verschiedenen Analysen ermittelten p-Werte gelten als signifikant, wenn $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1.1. Ermitteln der maximalen Bindungskapazität der Sep-Pak-Kartusche für Albumin

Es wurden für diesen Versuch je 1 Trennung von 5ml PBS mit 1000 μ g (200 μ g/ml), 500 μ g (100 μ g/ml), 250 μ g (50 μ g/ml) und 125 μ g (25 μ g/ml) Albumin durchgeführt. Von Interesse war vor allem die Proteinmenge, ab der sich in der Fraktion 1 kein Protein mehr nachweisen lässt als Zeichen dafür, dass das gesamte Albumin an die Kartuschenmatrix gebunden wird. Die Konzentrationen wurden mittels Bradford-Assay bestimmt.

Abbildung 1



Darstellung des Mittelwertes aus Duplikaten.

Aus der Abbildung 1 kann man entnehmen, dass mit sinkender aufgegebener Albuminmenge die Proteinkonzentration in der Fraktion 1 erwartungsgemäß zurückgeht. Ab 125 μ g Albumin lässt sich in der Fraktion 1 kein Protein mehr nachweisen. Bei der nächsthöheren aufgegebenen Menge von 250 μ g findet sich in Fraktion 1 noch 137 μ g Albumin, so dass die maximale Bindungskapazität der Sep-Pak-Kartusche bei ca. 150 μ g liegt (siehe auch Tabelle 2).

Tabelle 2: Sep-Pak-Trennung von je 5ml Albuminlösung in Konzentrationen von 25 bis 200µg/ml

| Fraktion/ AN % | Albumin 1000µg (200µg/ml) | Albumin 500µg (100µg/ml) | Albumin 250µg (50µg/ml) | Albumin 125µg (25µg/ml) |
|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| eingesetzt | 985 | 492 | 377 | 192 |
| F1/ 0 | 486 | 256 | 137 | 0 |
| F2/ 0 | 124 | 81 | 74 | 0 |
| F3/ 5 | 0 | 79 | 64 | 0 |
| F4/ 10 | 40 | 86 | 85 | 0 |
| F5/ 15 | 95 | 94 | 102 | 0 |
| F6/ 20 | 101 | 113 | 124 | 81 |
| F7/ 30 | 106 | 133 | 131 | 0 |
| F8/ 40 | 245 | 259 | 227 | 103 |
| F9/ 60 | 134 | 198 | 220 | 49 |
| F10/ 80 | 147 | 215 | 243 | 124 |
| Summe F1-F10 | 1480 | 1513 | 1407 | 357 |
| Summe in % aufgegeben | 150 | 307 | 373 | 185 |

Mittelwerte von Duplikaten, alle Werte soweit nicht anders angegeben in µg.

Die Fraktionen zeigen mit zunehmendem Acetonitrilgehalt kontinuierlich ansteigende Absorptionen, die ermittelten Proteinmengen aller Fraktionen liegen additiv deutlich über der auf die Kartusche aufgegebenen jeweiligen Proteinmenge.

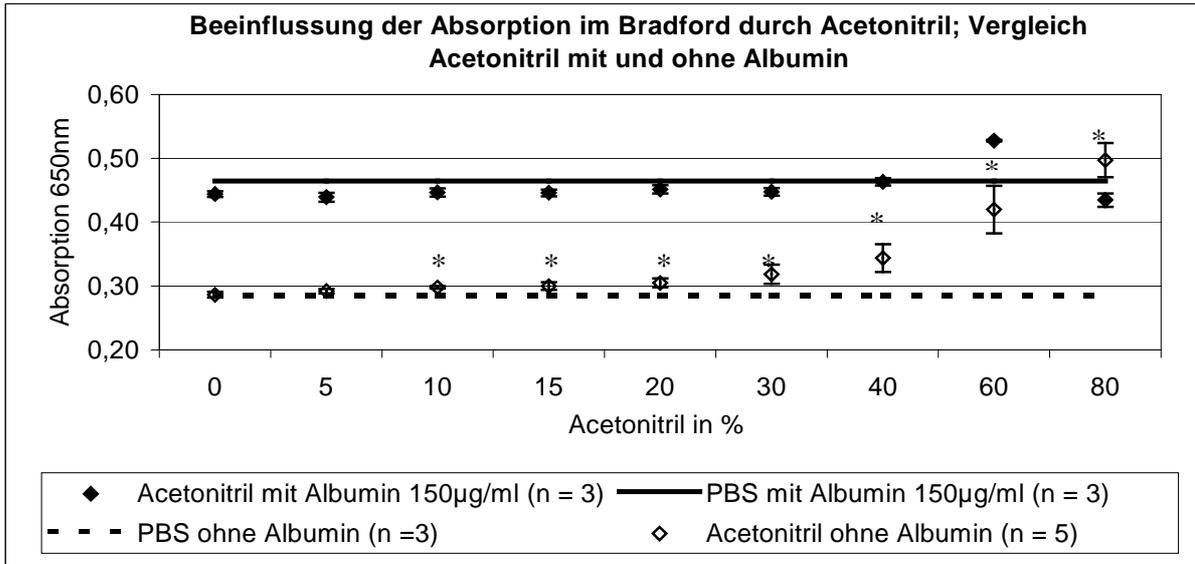
So ist anzunehmen, dass es sich hier um ein Artefakt handelt, es liegt dabei der Verdacht nahe, dass die Acetonitrilkonzentration die Absorption im Bradford-Assay beeinflusst.

4.2. Bradford-Messungen

4.2.1. Beeinflussung des Bradford-Assay durch den Acetonitrilgehalt

Eine Messung der proteinfreien Waschpuffer der verschiedenen Acetonitrilkonzentrationen in TFA 0,1% (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 und 80% Acetonitril) zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Absorption bei 650nm mit zunehmender Acetonitrilkonzentration. Bei Zugabe von 20µl Albumin 0,5% zu je 980µl Waschpuffer (Konzentration 100µg/ml) ist bei 60% Acetonitril ein deutlicher Anstieg sowie bei 80% Acetonitril ein Abfall der Absorption zu verzeichnen. In den niedrigen Acetonitrilkonzentrationen zeigen sich vergleichbare Absorptionen zum PBS mit Albumin in gleicher Konzentration.

Abbildung 2



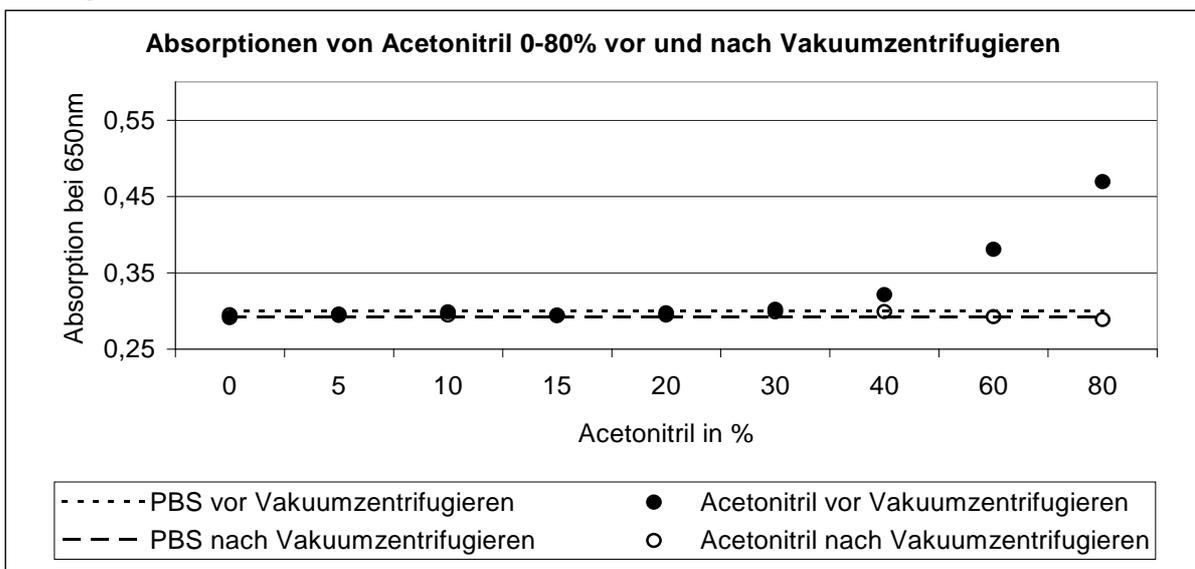
* $p < 0,005$ im Mann-Whitney-U-Test für Acetonitril ohne Albumin im Vergleich zu Acetonitril 0%. Aufgrund zu wenigen Messwerten keine Bestimmung von p-Werten für Acetonitril mit Albumin.

Diese Zunahme der Absorptionen bei 650nm ist somit auf den Acetonitrilgehalt der Waschpuffer zurückzuführen und interferiert mit dem Bradford-Assay bzw. dem -Reagenz. Aufgrund der vorhandenen technischen Möglichkeiten sollte versucht werden, das Acetonitril durch Verdampfen mittels Vakuumzentrifuge aus den Lösungen zu entfernen.

4.2.2. Entfernung von Acetonitril durch Vakuumzentrifugieren

Es erfolgten Bradford-Assay-Messungen von Duplikaten der Waschpuffer mit Acetonitril in verschiedenen Konzentrationen vor und nach Vakuumzentrifugieren im Vergleich zu PBS.

Abbildung 3

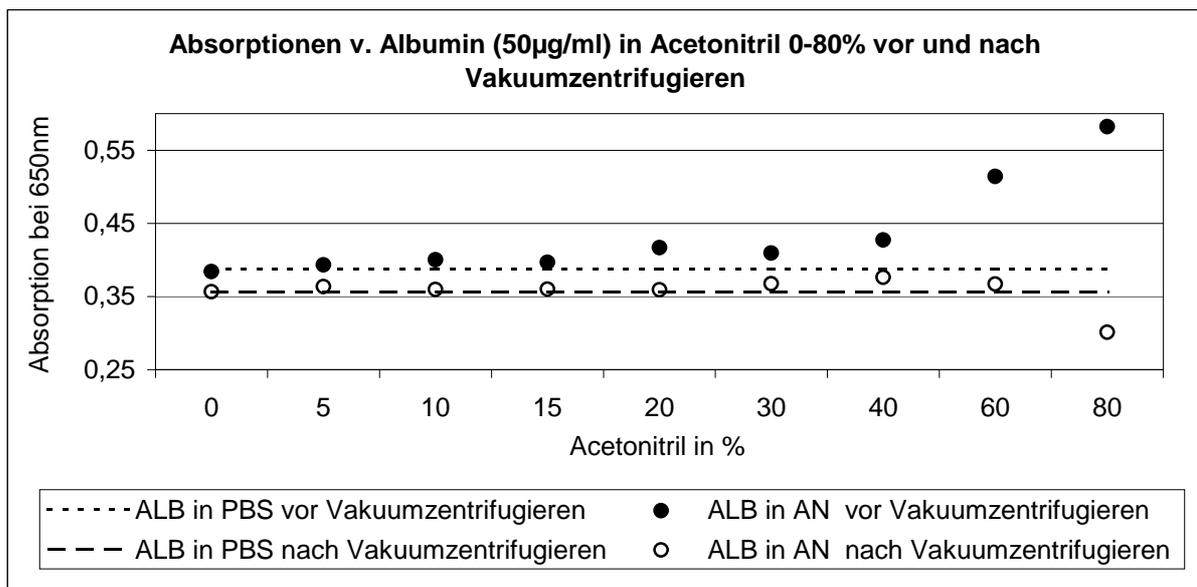


Die Bestimmung der Absorption erfolgte in Duplikaten mit Darstellung des Mittelwertes. Aufgrund dessen wird keine statistische Analyse vorgenommen.

Vor dem Vakuumzentrifugieren zeigen die höheren Acetonitrilkonzentrationen den schon beschriebenen Absorptionsanstieg im Bradford-Assay, der sich nach dem Vakuumzentrifugieren und Wiederauflösen in PBS nicht finden lässt. Somit ist davon auszugehen, dass das mit dem Bradford-Assay interferierende Acetonitril auf diesem Weg aus den Lösungen entfernt werden kann.

4.2.3. Vergleich der Absorptionen von Albumin-Acetonitrilmischungen mit und ohne Vakuumzentrifugieren

Abbildung 4



Die Bestimmung der Absorption erfolgte in Duplikaten mit Darstellung des Mittelwertes. Aufgrund dessen erfolgt keine statistische Analyse.

Neuerlich zeigt sich die bereits beschriebene Steigerung der Bradford-Assay-Absorption. Nach Trocknen und Auflösen in PBS sind die Absorptionen im Bereich der Albumin-PBS-Vergleichslösung, jedoch zeigt sich in der 80%igen Acetonitrillösung eine Reduktion der Absorption unter die zu erwartenden Werte.

Aus den Versuchen kann gefolgert werden, dass Vakuumzentrifugieren und Resuspendieren in PBS bei Acetonitrilkonzentrationen bis 60% ein geeignetes Verfahren ist, um den Einfluss des Acetonitril auf die Bradfordmessungen auszuschalten. Bei einer Acetonitrilkonzentration über 60% wird Albumin durch das Acetonitril anscheinend denaturiert, so dass die für die Bradfordmessungen erforderlichen Aminogruppen nicht mehr reaktionsfähig sind.

4.2.4. Absorptionen von Insulin- und Cytochrom C-Acetonitrilgemischen nach Vakuumzentrifugieren

Analog zum Albumin sollte geprüft werden, ob sich durch Vakuumzentrifugieren der Einfluss des Acetonitril im Bradford-Assay auch bei Lösungen von Insulin und Cytochrom C ausschalten lässt. Die Proteinlösungen wurden entsprechend getrocknet und in PBS gelöst, auf die Absorptionsmessung vor Entfernung des Acetonitril wurde verzichtet.

Tabelle 3: Absorptionen im Bradford-Assay von Insulin und Cytochrom C bei ansteigender Acetonitrilkonzentration nach Vakuumzentrifugieren.

| Konzentration Acetonitril in % | Absorption Insulin 40µg/ml | Absorption Cytochrom C 150µg/ml |
|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| 0 (=Referenz) | 0.363 | 0.509 |
| 10 | nicht gemessen | 0.534 |
| 20 | 0.361 | 0.570 |
| 30 | nicht gemessen | 0.511 |
| 40 | 0.357 | 0.512 |
| 60 | nicht gemessen | 0.510 |
| 80 | 0.355 | 0.499 |

Mittels Mann-Whitney-U-Test lassen sich für die Absorption von Insulin (n=4 pro Acetonitrilkonzentration) keine Unterschiede ($p > 0,05$) finden. Für Cytochrom C erfolgt aufgrund geringer Probenzahl (n=2) keine statistische Auswertung.

Die Bradford-Assay-Absorptionen der verschiedenen Proteine liegen nach dem Entfernen des Acetonitril im Bereich der jeweiligen Referenz (Protein in gleicher Konzentration mit PBS verdünnt, getrocknet und resuspendiert). Der für Albumin gesehene Effekt der hohen Acetonitrilkonzentration von 80% auf die Absorption lässt sich nicht für Insulin und auch nicht für Cytochrom C nachweisen, diese bleiben auch nach Vakuumzentrifugieren in den ehemals hohen Acetonitrilkonzentrationen konstant.

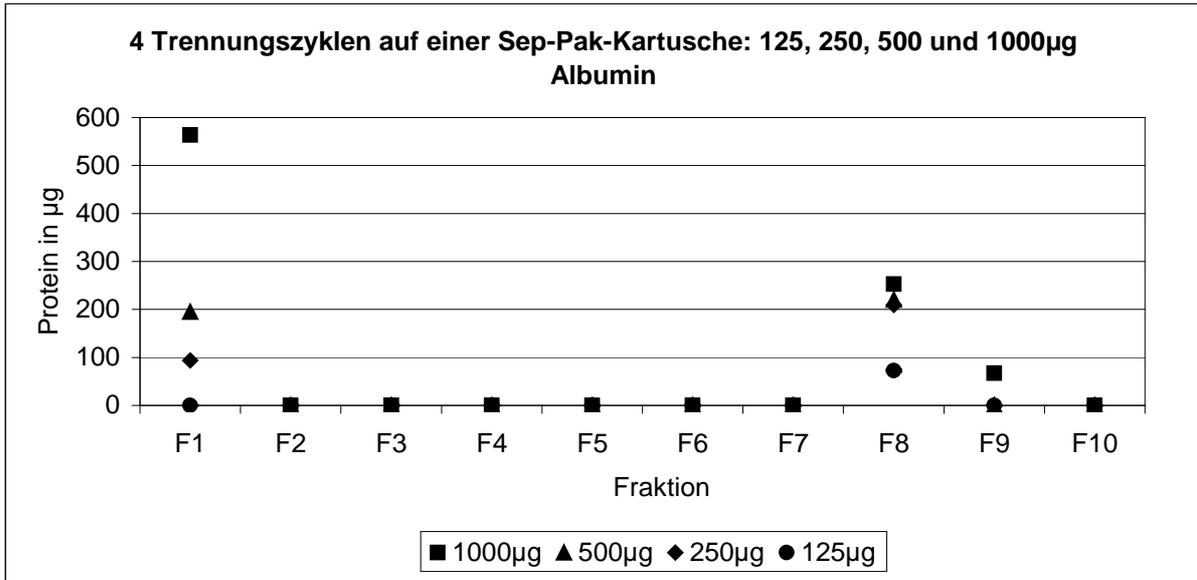
4.2.5. Wiederholen der Bradfordmessung für die Fraktionen aus der Sep-Pak-Trennung

3.1.1. nach Trocknen und Wiederauflösen in PBS

Die Fraktionen und Standards aus Versuch 3.1.1. (zwischenzeitliche Lagerung bei -20°C) wurden nach Vakuumzentrifugieren in der Speedvac wieder in PBS gelöst und ein zweites Mal gemessen. Es zeigt sich wie in den vorangegangenen Versuchen, jedoch durch die Ausschaltung des Einflusses von Acetonitril viel deutlicher, die Anreicherung von Protein in Fraktion 8/ Acetonitril 40%.

Unter Trennung mit 1000µg Albumin ist zusätzlich in der Fraktion 9 Protein nachweisbar.

Abbildung 5



Darstellung des Mittelwertes aus Duplikaten.

Tabelle 4: Sep-Pak-Trennung von je 5ml Albuminlösung in Konzentrationen von 25 bis 200µg/ml. Mittelwerte aus zwei Messwerten.

| Fraktion/ AN % | Albumin 1000µg (200µg/ml) | Albumin 500µg (100µg/ml) | Albumin 250µg (50µg/ml) | Albumin 125µg (25µg/ml) |
|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| eingesetzt | 1045 | 523 | 343 | 99 |
| F1/ 0 | 564 | 195 | 94 | 0 |
| F2/ 0 | 0 | 0 | 51 | 0 |
| F3/ 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F4/ 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F5/ 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F6/ 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F7/ 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F8/ 40 | 253 | 220 | 210 | 73 |
| F9/ 60 | 67 | 0 | 0 | 0 |
| F10/ 80 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Summe F1-F10 | 884 | 415 | 355 | 73 |
| Summe in % aufgegeben | 85 | 79 | 103 | 74 |

Mittelwerte von Duplikaten, alle Werte soweit nicht anders angegeben in µg.

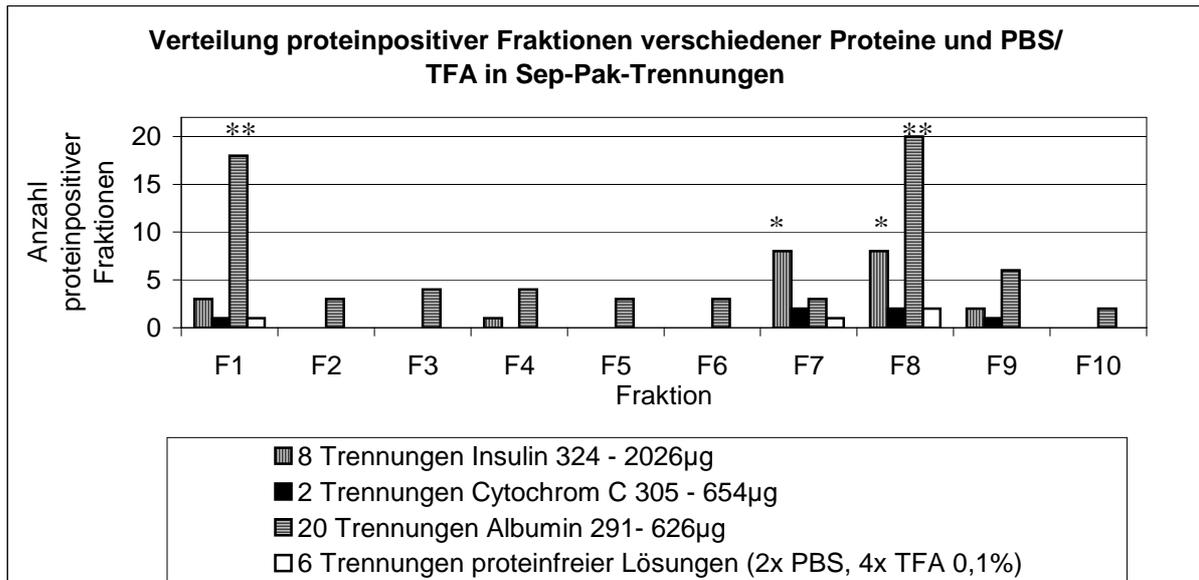
Es lassen sich für die einzelnen Trennungen Wiederfindungsraten berechnen, so dass eine Aussage getroffen werden kann, wieviel des eingesetzten Proteins durch dieses Trennungsverfahren „verlorengeht“. Diese Wiederfindungsrate läge nach dem obigen Versuch für Albumin zwischen 74 und 103%; Mittelwert 85% der eingesetzten Proteinmenge. Wie sich aber in den folgenden Versuchen zeigen lässt, ist von einer Beimischung des zum Sättigen eingesetzten Proteins auszugehen, wodurch zu hohe Wiederfindungsraten berechnet werden.

4.3. Sep-Pak-Trennungen

4.3.1. Verteilung proteinpositiver Fraktionen bei Sep-Pak-Trennungen von Albumin, Insulin, Cytochrom C und proteinfreier Lösung

Um die Verteilung von verschiedenen Proteinen auf die Sep-Pak-Fractionen zu untersuchen, erfolgten mit Albumin 20, mit Insulin 8, mit Cytochrom C 2 und mit proteinfreier Lösung (PBS bzw. TFA 0,1%) 6 Sep-Pak-Trennungen.

Abbildung 6



* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; nicht markierte Säulen sind nicht signifikant. Für Cytochrom C erfolgte aufgrund der wenigen Trennungen keine statistische Analyse.

Tabelle 5: prozentuale Verteilung der eingesetzten Proteine (Insulin, Cytochrom C bzw. Albumin) auf die Sep-Pak-Fractionen

| Fraktion/ AN % | Prozentuale Verteilung verschiedener Proteine (in % der eingesetzten Menge) | | |
|----------------|--|-----------------|--------------|
| | Insulin n=8 | Cytochrom C n=2 | Albumin n=20 |
| F1/ 0 | 0 | 0 | 14 |
| F2/ 0 | 0 | 0 | 0 |
| F3/ 5 | 0 | 0 | 0 |
| F4/ 10 | 0 | 0 | 0 |
| F5/ 15 | 0 | 0 | 0 |
| F6/ 20 | 0 | 0 | 0 |
| F7/ 30 | 69 | 38 | 0 |
| F8/ 40 | 26 | 34 | 47 |
| F9/ 60 | 0 | 0 | 0 |
| F10/ 80 | 0 | 0 | 0 |

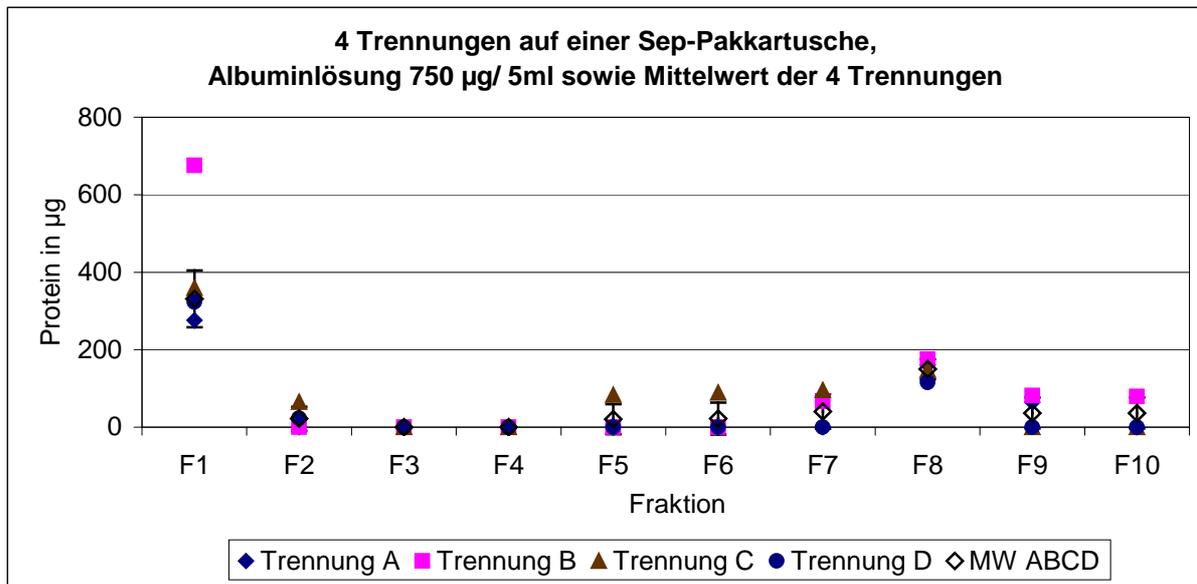
Es zeigte sich die dargestellte Verteilung, es fanden sich signifikante Proteinnachweise für Albumin in den Fraktionen 1 und 8 ($p < 0,001$), für Insulin in den Fraktionen 7 und 8 ($p < 0,01$).

Für Cytochrom C kann aufgrund zu niedriger Anzahl von Trennungen keine statistisch relevante Aussage getroffen werden. Bei Einsatz proteinfreier Lösungen finden sich keine signifikant positiven Fraktionen.

4.3.2. Wiederholbarkeit der Sep-Pak-Trennung auf einer Sep-Pak-Kartusche

Zur Kontrolle der mehrfachen Nutzbarkeit der Kartusche wurden vier identische Trennungen von je 750µg Albumin in 5ml PBS (150µg/ml) auf einer Kartusche nach vorherigem Sättigen mit 2500µg Albumin durchgeführt.

Abbildung 7



Für Trennungen A, B, C, D Darstellung des Mittelwertes aus Duplikaten. MW ABCD stellt den Mittelwert aller insgesamt 8 Messwerte der Trennungen A, B, C und D dar.

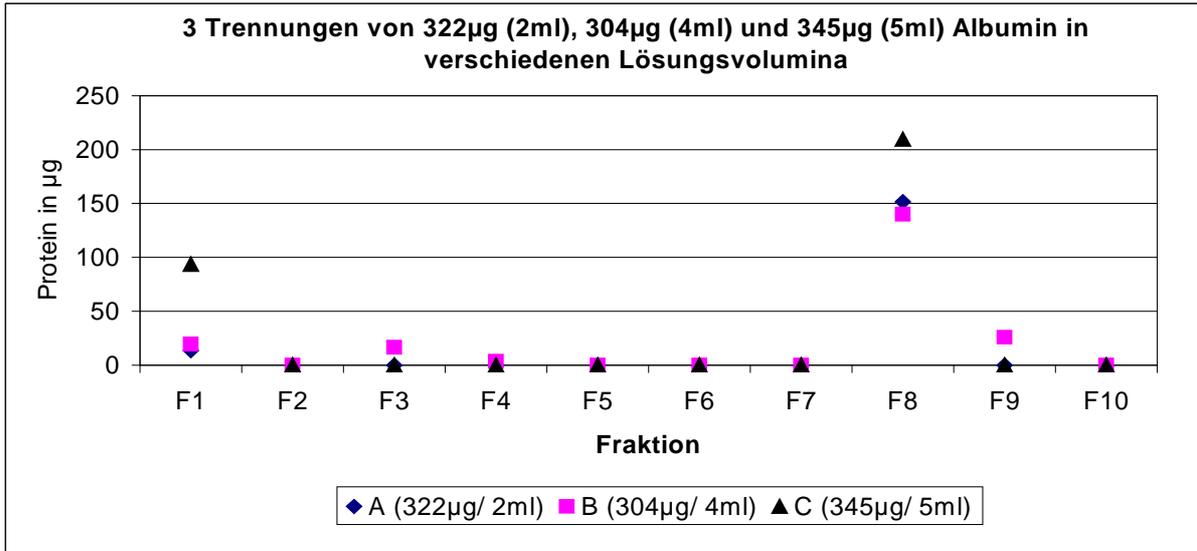
Die Verteilung und die Menge des ausgewaschenen Proteins verändern sich durch eine bis zu dreimalige Benutzung einer Sep-Pak-Kartusche hinsichtlich Bindungsvermögen und Trennschärfe nicht. In der 4. Trennung (D) findet sich im Vergleich zum Mittelwert aller Trennungen in der Fraktion 8 ein Abfall der Proteinkonzentration.

In der Trennung B ist die in Fraktion 1 gemessene Proteinmenge deutlich höher. Die Einzelmesswerte für die Fraktion 1 der Trennung B (Duplikate: 394; 956; Mittelwert 675; Standardabweichung 280) liegen jedoch so weit auseinander, dass ein Fehler wahrscheinlich ist.

4.3.3. Einfluss des Waschpuffervolumens auf die Proteinverteilung der Sep-Pak-Fraktionen

Um den Einfluss des Waschpuffervolumens bei gleicher Proteinmenge auf die Sep-Pak-Kartusche zu prüfen, wurde die vergleichbare Menge Albumin (322µg bzw. 304µg) in 2ml und in 4ml PBS gelöst und mit Waschpuffern von 2ml bzw. 4ml Volumen getrennt und mit einem früheren Versuch mit 345µg Albumin in 5ml PBS (69µg/l) und je 5ml Waschpuffer verglichen.

Abbildung 8



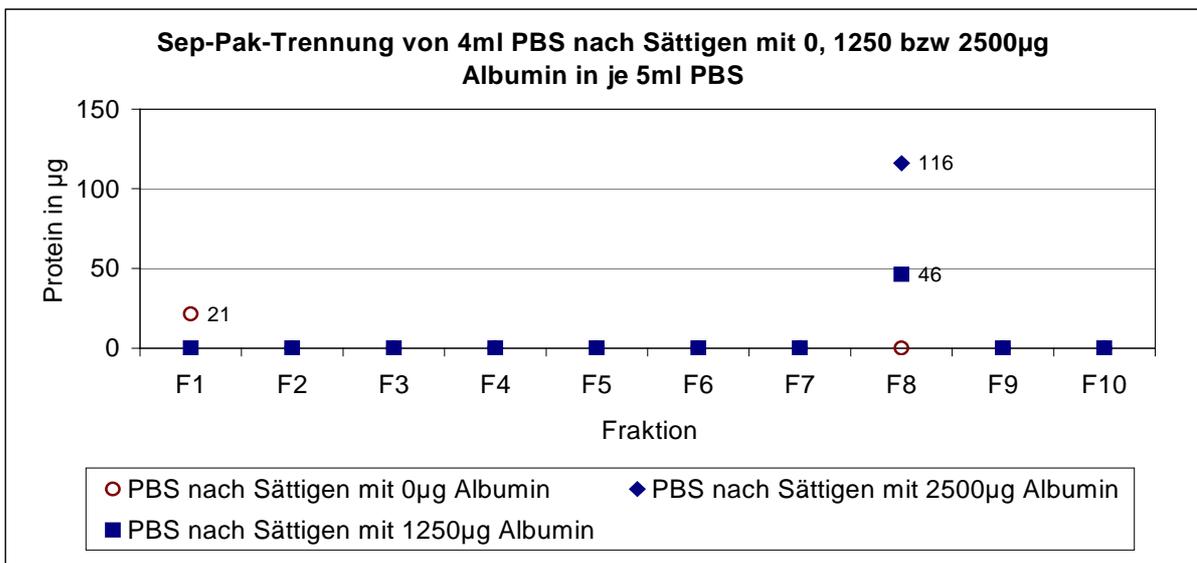
Für Trennungen A B, C Darstellung des Mittelwertes aus Duplikaten.

Es zeigen sich insbesondere zwischen 2 und 4ml Volumen keine Unterschiede in den Fraktionen 1 und 8 sowie der Gesamtmenge an ausgewaschenem Protein, einmalig lässt sich auch in Fraktion 9 Protein nachweisen. In Trennung C/ 5ml ist die Proteinmenge in Fraktion 1 und 8 höher, was sich auch in der Wiederfindungsrate abbildet.

4.3.4. Sättigen der Sep-Pak-Kartusche mit verschiedenen Albuminmengen und PBS als Standard (I)

Um abzuklären, inwieweit das zum Sättigen benutzte Albumin in den Sep-Pak-Fractionen nachweisbar ist, wurden drei Sep-Pak-Kartuschen mit 0, 1250 und 2500 μ g Albumin (gelöst in PBS) gesättigt und nachfolgend auf diesen Kartuschen als Probe je einmal 4ml PBS getrennt.

Abbildung 9



Mittelwerte aus zwei Messungen

Wird die Kartusche mit albuminfreier PBS-Lösung gesättigt, lässt sich in der anschließenden Trennung kein Protein nachweisen (Ausnahme: Fraktion 1, Wert entspricht Beginn des Messbereiches im Bradford-Assay).

Erfolgt das Sättigen mit 1250 bzw. 2500 μ g Albumin, lässt sich in der Fraktion 8 Protein nachweisen, auch wenn als Probe PBS genutzt wurde.

Dieser Umstand hat Einfluss auf die Proteinverteilung in den vorangegangenen Sep-Pak-Trennungen und den daraus berechneten Wiederfindungsraten.

Es ist also erforderlich, zum Sättigen die Albuminmenge so zu wählen, dass die folgende Sep-Pak-Trennung nicht verfälscht wird.

4.3.5. Ermitteln der optimalen Albuminmenge zum Sättigen der Sep-Pak-Kartusche

Es wurden auf vier ungesättigten Sep-Pak-Kartuschen je eine Trennung von 4ml Albuminlösung mit 131, 167, 310 und 379 μ g Albumin durchgeführt. Gesucht wurde dabei die Proteinmenge, die so vollständig gebunden wird, dass in keiner Sep-Pak-Fraktion mehr Protein nachweisbar ist.

Tabelle 6: Sep-Pak-Trennungen mit steigender Albuminmenge.

| Werte in μ g Fraktion/ AN % | Trennung D MW | Trennung A MW | Trennung B MW | Trennung C MW |
|------------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| eingesetzt | 131 | 167 | 310 | 379 |
| F1/ 0 | 26 | 24 | 23 | 27 |
| F2/ 0 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| F3/ 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F4/ 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F5/ 15 | Werte der Fraktionen nicht gemessen | | | |
| F6/ 20 | 7 | 0 | 0 | 4 |
| F7/ 30 | 4 | 0 | 9 | 10 |
| F8/ 40 | 34 | 52 | 77 | 83 |
| F9/ 60 | 17 | 21 | 33 | 39 |
| F10/ 80 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Summe | 97 | 96 | 141 | 162 |
| % eingesetzt | 74 | 58 | 46 | 43 |

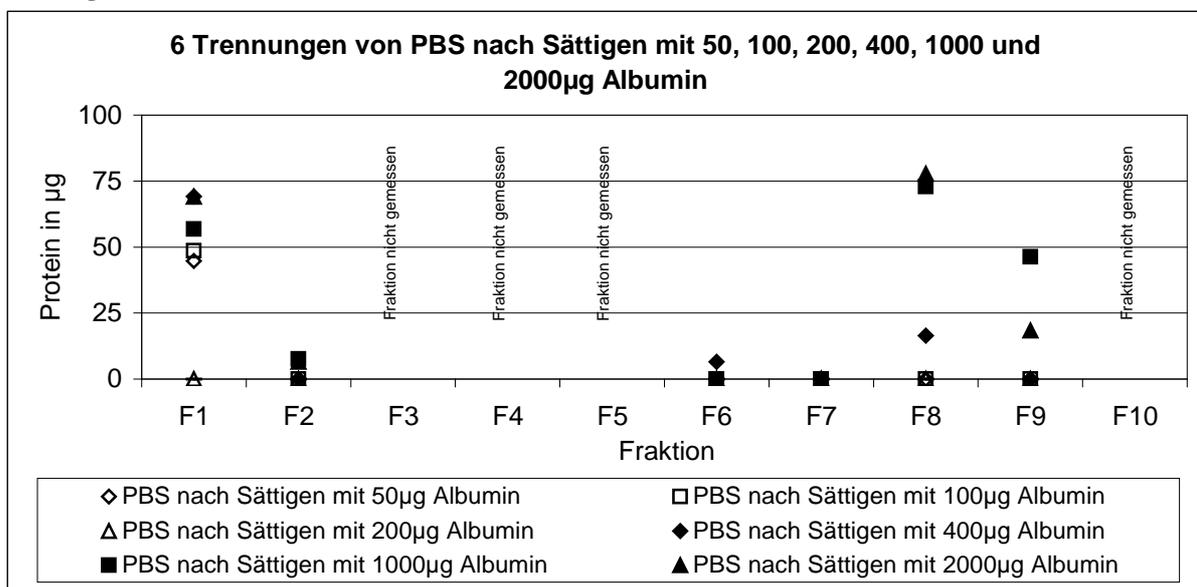
Fraktion 5 wurde in den Sep-Pak-Trennungen gewonnen, aber aufgrund der zu erwartenden Proteinverteilung im Bradford-Assay nicht bestimmt. Mittelwerte aus 2 Messungen.

Es zeigt sich, dass in allen Trennungen proteinpositive Fraktionen vorhanden sind, v. a. die Fraktionen 8 und 9. Allerdings nimmt mit sinkender aufgegebenen Proteinmenge ebenfalls die ausgewaschene Menge ab, es ist aber kein Effekt einer irreversiblen Bindung erkennbar (keine überproportionale Abnahme). Die Proteinmengen der Fraktionen 8 und 9 der einzelnen Trennungen verhalten sich ähnlich wie die eingesetzten Mengen zueinander (siehe Tabelle 6).

4.3.6. Sättigen der Sep-Pak-Kartusche mit verschiedenen Albuminmengen und PBS als Standard (II)

Bei diesem Versuch wurden zur Ermittlung der maximalen Sättigungsmenge die Kartuschen mit einer immer geringeren Menge an Albumin (2000 μ g, 1000 μ g, 400 μ g, 200 μ g, 100 μ g und 50 μ g gelöst in 4ml PBS) gesättigt, danach mit Ethanol und TFA 0,1% gespült. Anschließend wurde mit den üblichen Waschpuffern gewaschen, wobei als Probe PBS genutzt wurde. Ziel war auch bei diesem Versuch, die Albuminmenge zum Sättigen zu finden, bei der in den Sep-Pak-Fractionen kein Protein nachweisbar ist. Der Proteingehalt der Fraktionen F3, F4, F5 sowie F10 wurde aufgrund der bekannten Verteilung des Albumins nicht bestimmt.

Abbildung 10



Die nicht gemessenen Fraktionen wurden in den Sep-Pak-Trennungen gewonnen, aber aufgrund der zu erwartenden Proteinverteilung im Bradford-Assay nicht bestimmt. Mittelwerte aus zwei Messungen.

Bis zu einer Sättigungsmenge von 200 μ g Albumin bleiben die Sep-Pak-Fractionen der nachfolgenden Trennungen für Proteine negativ, werden jedoch 250 μ g oder mehr zum Sättigen benutzt, lässt sich in Fraktion 8 und 9 Protein nachweisen.

Optimal wird die Kartusche also mit 200 μ g Albumin gesättigt.

4.3.7. Wiederfindungsraten von Albumin auf ungesättigten Kartuschen

Drei Sep-Pak-Trennungen erfolgten mit 363 μ g Albumin gelöst in 4ml auf ungesättigten Kartuschen zum Ermitteln der Wiederfindungsrate.

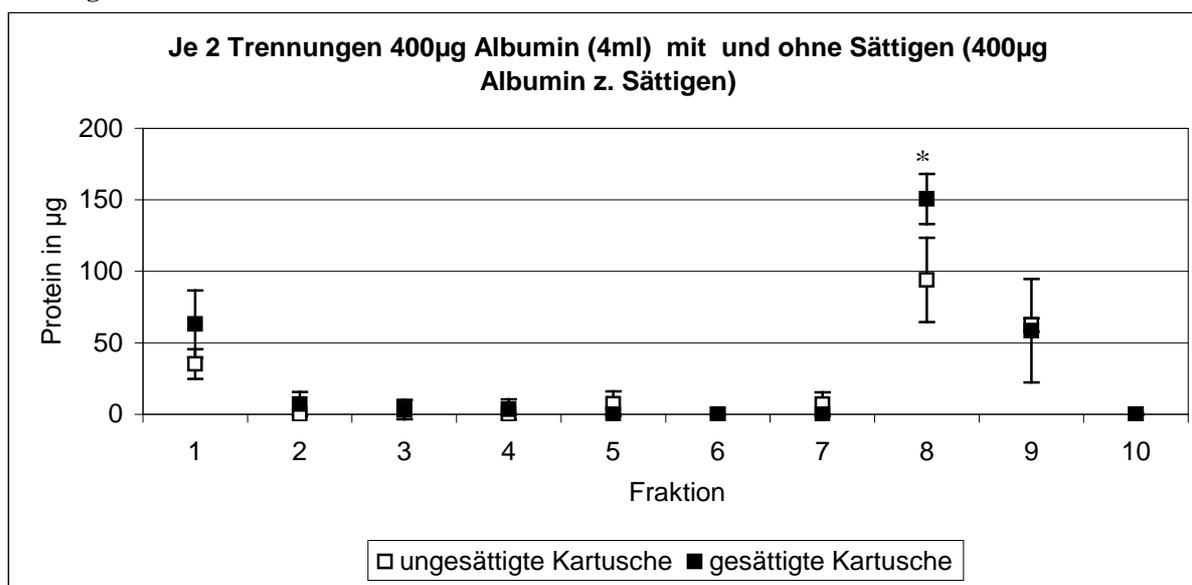
Tabelle 7: Wiederfindungsraten nach Sep-Pak-Trennungen von 363µg Albumin ohne Sättigen

| Fraktion/ AN % | MW aus 3 Trennungen | SD |
|----------------|---------------------|----|
| eingesetzt | 363 | 70 |
| F1/ 0 | 28 | 8 |
| F2/ 0 | 0 | 0 |
| F3/ 5 | 0 | 0 |
| F4/ 10 | 0 | 0 |
| F5/ 15 | 0 | 0 |
| F6/ 20 | 0 | 0 |
| F7/ 30 | 0 | 0 |
| F8/ 40 | 85 | 13 |
| F9/ 60 | 31 | 10 |
| F10/ 80 | 0 | 0 |
| Summe | 144 | 13 |
| % eingesetzt | 40 | |

Bei der Trennung auf ungesättigten Kartuschen sind die Fraktionen 1, 8 und 9 proteinpositiv. Dieses steht in guter Übereinstimmung mit den Trennungen von Albumin auf gesättigten Kartuschen (4.3.2/ Tabelle 5) mit Einschränkungen für die Fraktion 9. Allerdings ist die Wiederfindungsrate im Vergleich deutlich niedriger (dort 51/ 68/ 88%; hier 40%).

4.3.8. Wiederfindungsraten von Albumin auf gesättigten und ungesättigten Kartuschen

Um in einem Versuchsansatz Trennungen auf gesättigten und auf ungesättigten Kartuschen vergleichen zu können, wurden 4 Trennungen mit Albumin auf zwei mit 400µg Albumin gesättigten und zwei ungesättigten Kartuschen durchgeführt.

Abbildung 11

* $p < 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test (2 Trennungen mit 4 Messwerten pro Gruppe), nicht markierte Fraktionen $p > 0,05$

Tabelle 8: Vergleich von Sep-Pak-Trennungen auf gesättigten vs. ungesättigten Kartuschen.

| | Gesättigte Kartusche | | Ungesättigte Kartusche | |
|---------------------|----------------------|-----|------------------------|-----|
| | MW | SD | MW | SD |
| Eingesetzt | 402 | 186 | 402 | 186 |
| Summe d. Fraktionen | 272 * | 52 | 192 * | 17 |
| % eingesetzt | 68 | | 48 | |

* $p < 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test (2 Trennungen mit 4 Messwerten pro Gruppe).

Wie man der Grafik und der Tabelle entnehmen kann, liegen die Messwerte der Fraktion 8 und auch die Wiederfindungsrate der gesättigten Trennungen über denen der ungesättigten Trennungen. Die Unterschiede können durch eine Beimischung von Albumin vom Sättigen bedingt sein, die über der als optimal zum Sättigen bestimmten Menge von $200\mu\text{g}$ Albumin liegt. Das zum Sättigen benutzte Protein geht in die Messwerte mit ein, da bei Sättigen mit $400\mu\text{g}$ sich in Fraktion 8 (nach Versuch 4.3.5.) $16\mu\text{g}$ Sättigungsalbumin nachweisen lassen.

4.3.9. Wiederfindungsraten von Insulin, Cytochrom C und Albumin auf gesättigten und ungesättigten Kartuschen

Es erfolgten mehrere Sep-Pak-Trennungen von Albumin, Insulin und Cytochrom C auf gesättigten und ungesättigten Kartuschen zum Vergleich der Wiederfindungsraten.

Tabelle 9: Wiederfindungsraten von Insulin in Abhängigkeit vom Sättigen der Kartuschen.

| Fraktion/ AN % | mit $183\mu\text{g}$ - $246\mu\text{g}$ Albumin gesättigte Kartuschen | | ungesättigte Kartuschen | |
|--------------------|---|----|-------------------------|----|
| | MW | SD | MW | SD |
| Insulin eingesetzt | 344 | 37 | 344 | 37 |
| F1/ 0 | $0^{(n=4)}$ | 0 | $0^{(n=3)}$ | 0 |
| F2/ 0 | $0^{(n=2)}$ | 0 | $0^{(n=2)}$ | 0 |
| F3/ 5 | $0^{(n=2)}$ | 0 | $0^{(n=2)}$ | 0 |
| F4/ 10 | $0^{(n=2)}$ | 0 | $0^{(n=2)}$ | 0 |
| F5/ 15 | $0^{(n=2)}$ | 0 | $0^{(n=2)}$ | 0 |
| F6/ 20 | $0^{(n=2)}$ | 0 | $0^{(n=2)}$ | 0 |
| F7/ 30 | $327^{(n=4)}$ | 63 | $297^{(n=3)}$ | 35 |
| F8/ 40 | $62^{(n=4)}$ | 19 | $55^{(n=3)}$ | 7 |
| F9/ 60 | $0^{(n=2)}$ | 0 | $0^{(n=2)}$ | 0 |
| F10/ 80 | $0^{(n=2)}$ | 0 | $0^{(n=2)}$ | 0 |
| Summe | 389 | | 352 | |

$p > 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test für alle Vergleiche der Fraktionen und der Summe zwischen gesättigten und ungesättigten Trennungen. Insgesamt 7 Trennungen, Werte als Duplikate bestimmt.

^(n=x) gibt die Anzahl X der für jede Fraktion in die Berechnung einflussenden Trennungen ein, wechselnde Angaben entstehen durch in den Sep-Pak-Trennungen erhaltene, aber im Bradford-Assay nicht gemessene Fraktionen.

Tabelle 10: Wiederfindungsraten von Albumin in Abhängigkeit vom Sättigen der Kartuschen.

| Fraktion/ AN % | mit 246µg Albumin gesättigte Kartusche | | Ungesättigte Kartusche | |
|-----------------------|---|----|------------------------|----|
| | MW (n=3) | SD | MW (n=2) | SD |
| Albumin eingesetzt | 354 | 4 | 354 | 4 |
| F1/ 0 | 0 (22) ⁽¹⁾ | 25 | 26 | 24 |
| F2/ 0 – F7/ 30 | Fraktionen nicht gemessen | | | |
| F8/ 40 | 140 | 24 | 128 | 5 |
| F9/ 60 | 0 (14) ⁽¹⁾ | 16 | 0 | 0 |
| F10/ 80 | Fraktionen nicht gemessen | | | |
| Summe: | 140 | | 153 | |
| % eingesetzt | 40 | | 43 | |

$p > 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test für alle Vergleiche der Fraktionen und der Summe zwischen gesättigten und ungesättigten Trennungen. Insgesamt 5 Trennungen, Werte als Duplikate bestimmt.

⁽¹⁾ Wert wird aufgrund der Standardabweichung mit 0 angenommen. Nicht gemessene Fraktionen wurden in den Sep-Pak-Trennungen gewonnen, aber aufgrund der zu erwartenden Proteinverteilung im Bradford-Assay nicht bestimmt.

Tabelle 11: Wiederfindungsraten von Cytochrom C in Abhängigkeit vom Sättigen der Kartuschen.

| Fraktion/ AN % | mit 246µg Albumin gesättigte Kartusche | | Ungesättigte Kartusche | |
|---------------------------|---|----|------------------------|----|
| | MW (n=2) | SD | MW (n=2) | SD |
| Cytochrom C eingesetzt | 566 | 43 | 566 | 43 |
| F1/ 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F2/ 0 – F6 /20 | Fraktionen nicht gemessen | | | |
| F7/ 30 | 299 | 44 | 322 | 44 |
| F8/ 40 | 75 | 15 | 81 | 10 |
| F9/ 60 – F10/80 | Fraktionen nicht gemessen | | | |
| Summe: | 374 | | 409 | |
| % eingesetzt | 66 | | 72 | |

$p > 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test für alle Vergleiche der Fraktionen und der Summe zwischen gesättigten und ungesättigten Trennungen. Insgesamt 4 Trennungen, Werte als Duplikate bestimmt. Nicht gemessene Fraktionen wurden in den Sep-Pak-Trennungen gewonnen, aber aufgrund der zu erwartenden Proteinverteilung im Bradford-Assay nicht bestimmt.

In mehreren Sep-Pak-Trennungen auf gesättigten und ungesättigten Kartuschen mit den drei Proteinstandards Albumin, Cytochrom C und Insulin lassen sich keine Auswirkungen des Sättigens auf Proteinverteilung und Wiederfindungsrate feststellen. Insbesondere bestätigt sich nicht die Annahme, dass Sättigen mit Albumin mögliche irreversible Bindungen an Kartuschenmatrix und –oberflächen reduzieren und so die Ausbeute erhöhen kann.

Für Insulin und Cytochrom C bestätigt sich die Verteilung der proteinpositiven Fraktionen, nämlich Fraktion 7 (30% Acetonitril) und Fraktion 8 (40% Acetonitril). Die größere Proteinmenge ist dabei in Fraktion 7 nachweisbar. Albumin ist in den Fraktionen 1 und 8 nachweisbar.

Es kann geschlussfolgert werden, dass Sättigen der Sep-Pak-Kartuschen keine Auswirkungen auf die folgende Sep-Pak-Trennung hat. Aus diesem Grund wird in weiteren Versuchen auf das Sättigen mit Albumin verzichtet.

4.3.10. Sep-Pak-Trennung eines Proteingemisches von Albumin und Insulin

Zur Kontrolle des Verhaltens von Proteinen in Gemischen bei der Sep-Pak-Trennung im Vergleich zu Trennungen der reinen Proteine wurden 4ml eines 1:1 Gemisches von 200µg Albumin und 200µg Insulin (Proteinkonzentration der Probe 100µg/ml) getrennt.

Tabelle 12: 2 Sep-Pak-Trennungen eines Albumin-Insulingemisches

| Fraktion/ AN % | Insulin/ Albumin als Gemisch getrennt, n=2 | |
|----------------|--|----|
| | MW | SD |
| eingesetzt | 411 | 0 |
| F1/ 0 | 0 | 0 |
| F2/ 0 | 0 | 0 |
| F3/ 5 | 0 | 0 |
| F4/ 10 | 0 | 0 |
| F5/ 15 | 0 | 0 |
| F6/ 20 | 0 | 0 |
| F7/30 | 183 | 16 |
| F8/ 40 | 131 | 3 |
| F9/ 60 | 0 | 0 |
| F10/ 80 | 0 | 0 |
| Summe | 315 | |
| % eingesetzt | 77 | % |

2 Sep-Pak-Trennungen, Mittelwerte aus den Duplikaten pro Trennung. Werte in µg, wenn nicht anders angegeben.

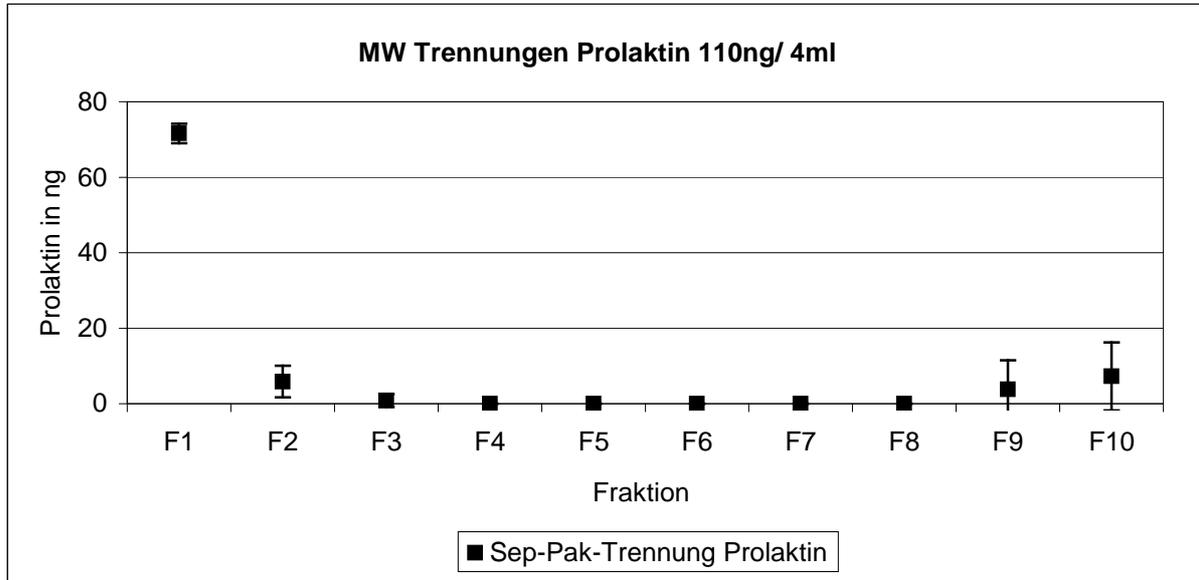
Die Proteinverteilung entspricht den zu erwartenden Werten, da in den Trennungen der reinen Proteine Insulin vorwiegend in Fraktion 7 und Albumin in Fraktion 8 ausgewaschen wird, auch die Wiederfindungsrate (zu erwarten 79%) wird durch das Trennen eines Proteingemisches nicht beeinflusst.

Aus diesem Versuch ergeben sich keine Hinweise dafür, dass sich in der Sep-Pak-Trennung von Proteingemischen das Bindungsverhalten der enthaltenen Proteine im Vergleich zur Einzellösung verändert.

4.3.11. Sep-Pak-Trennung von Prolaktin

Als weiterer Standard neben Albumin, Cytochrom C und Insulin wurden zwei Sep-Pak-Trennungen mit Prolaktin in einer absoluten Menge von je 110ng durchgeführt. Wie bei den anderen Standards standen die positiven Fraktionen und die Ausbeute im Vordergrund des Interesses. Die Messung erfolgte mittels Prolaktin-Elisa.

Abbildung 12



Mittelwert von 2 Sep-Pak-Trennungen Prolaktin. Messwerte pro Trennung als Duplikate.

Es sind die Fraktionen 1 und 2 proteinpositiv. Nach Korrektur unter Berücksichtigung der Standardabweichungen in Hinblick auf Fraktion 9 und 10 ergibt sich eine Ausbeute von 71%.

4.3.12. 13 Sep-Pak-Trennungen von Albumin zur Berechnung der Interassayvarianz

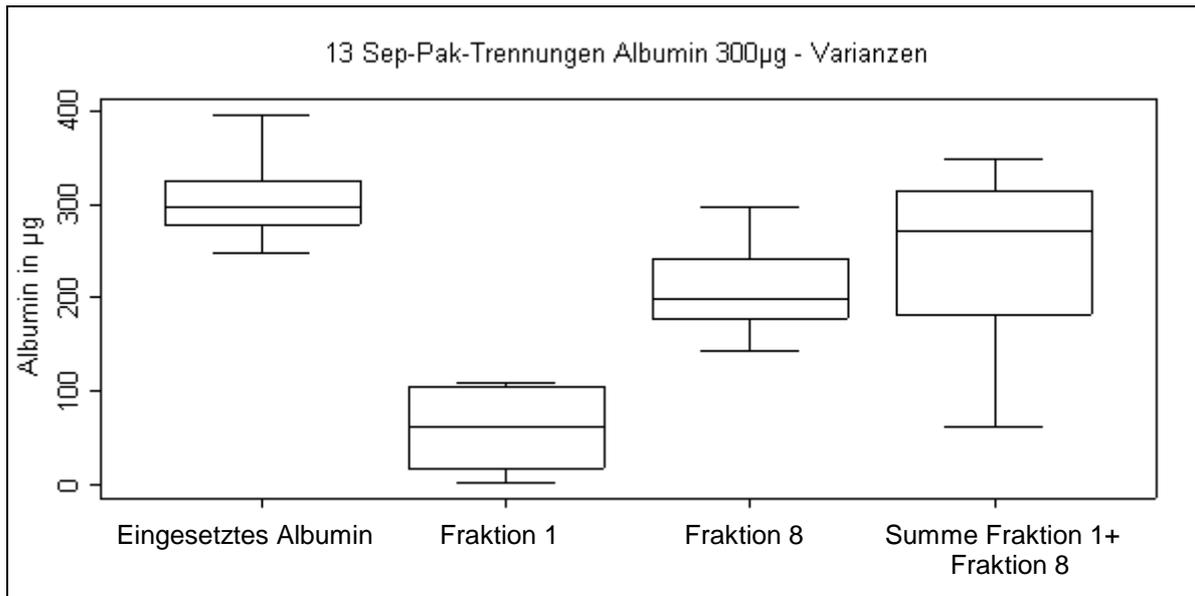
Zur Berechnung der Interassayvarianzen von Sep-Pak-Trennungen wurden 13 Sep-Pak-Trennungen von je 4ml Albumin 75µg/l / 300µg absolut durchgeführt. Gemessen wurden aufgrund der bekannten Verteilung von Albumin auf die Sep-Pak-Fraktionen nur die Fraktionen 1 und 8 sowie die Konzentration des eingesetzten Albumins.

Tabelle 13: Varianzen von 13 Sep-Pak-Trennungen Albumin 300µg gemessen in einem Bradfordassay.

| Fraktion | MW | SD |
|-----------------------|-----|----|
| Eingesetzt | 305 | 39 |
| Fraktion 1 | 57 | 42 |
| Fraktion 8 | 208 | 43 |
| Summe F1 + F8 | 265 | 85 |
| Summe in % eingesetzt | 87 | |

Nicht angegebene Fraktionen (Fraktion 2-7 sowie 9 und 10) wurden in den Sep-Pak-Trennungen gewonnen, aber aufgrund der zu erwartenden Proteinverteilung im Bradford-Assay nicht bestimmt.

Abbildung 13



Box-Plot-Darstellung von eingesetzter Albuminmenge, Fraktion 1, 8 und Summe von Fraktion 1 und 8 mit Mittelwert, oberem und unterem Quartil.

Für die Fraktion 8/ Acetonitril 40%, in der bei allen Trennungen Protein eindeutig nachweisbar war, beträgt die prozentuale Standardabweichung 21%.

Die durchschnittliche Ausbeute aller Sep-Pak-Trennungen liegt bei 87% des eingesetzten Albumins.

Eine gute Konstanz lässt sich für das Auswaschen des Albumins mit einer bestimmten Fraktion/ Acetonitrilkonzentration zeigen. So ist in der Fraktion 8 / Acetonitril 40% stets Protein nachweisbar, in Fraktion 1 nur bei einem Teil der Trennungen.

4.4. Sep-Pak-Trennungen und Zellversuche

4.4.1. Negativkontrollen

4.4.1.1. ³H-Thymidininkorporation von Sep-Pak-Fractionen von TFA 0,1%

Als Probe im Rahmen von mehreren Sep-Pak-Trennungen wurde TFA 0,1% getrennt und in den Zellversuchen als Negativkontrolle zur Kontrolle des Einflusses auf die Zellen eingesetzt. Es erfolgte eine Bestimmung der Zellproliferation mittels ³H-Thymidininkorporation.

Tabelle 14: ³H-Thymidininkorporation nach Inkubation mit Sep-Pak-Fractionen von TFA 0,1%.

| Mittelwerte Fraktion / AN in % | TFA 1 cpm | TFA 2 cpm | TFA 3 cpm |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| TFA | 547 | 586* | 243* |
| F1/ 0 | 644 | 641 | 277 |
| F2/ 0 | 516 | 465* | 389* |
| F3/ 5 | 372* | 428* | 363* |
| F4/ 10 | 398* | 371* | 314 |
| F5/ 15 | 493* | 491* | 375* |
| F6/ 20 | 567 | 419* | 364 |
| F7/ 30 | 828 | 725 | 340 |
| F8/ 40 | 663 | 751 | 435* |
| F9/ 60 | 812 | 1099 | 373* |
| F10/ 80 | 877 | 594 | 485* |
| Positivkontrolle Adenosin | 11393 (n=8) | 12695 (n=8) | 15939 (n=8) |
| Negativkontrolle SF-DM/ F12 | 884 (n=15) | 833 (n=20) | 308 (n=8) |
| Negativkontrolle+2xSD | 1463 | 1340 | 367 |
| Negativkontrolle-2xSD | 305 | 325 | 248 |

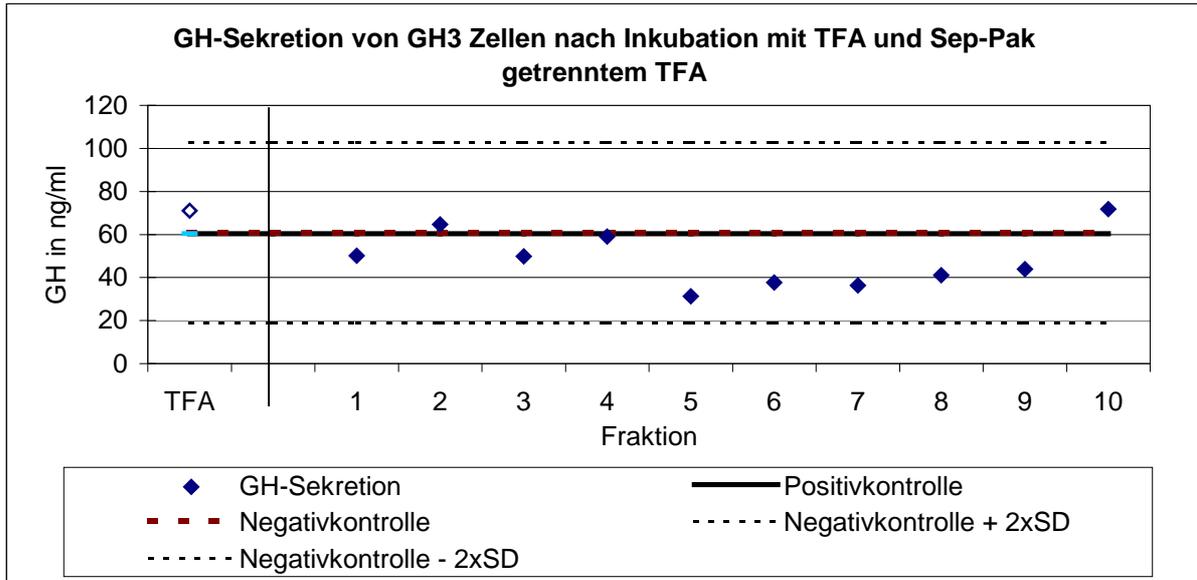
* $p < 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test im Vergleich eingesetztes TFA 0,1%/ Fraktion gegen die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12. Die Fraktionen und TFA wurden jeweils als 3fach-Bestimmung, Negativkontrollen wie angegeben im Zellversuch eingesetzt. Unterschiedliche Werte für Positiv- und Negativkontrollen durch Ansatz auf verschiedenen Multititerplatten.

In allen drei Sep-Pak-Trennungen von TFA 0,1% finden sich Hemmungen der Zellproliferationen, ausgedrückt durch die verminderte ³H-Thymidininkorporationen in der Fraktion 3 sowie Fraktion 5 aller Trennungen. Das Verteilungsmuster der auffälligen Fraktionen lässt keinen systemischen Effekt erkennen, so dass eine Abhängigkeit von den eingesetzten Puffern nicht wahrscheinlich ist. Eine Steigerung der Proliferation findet sich nicht.

4.4.1.2. GH-Sekretion von Sep-Pak-Fractionen von TFA 0,1%

Auf einer weiteren Multititerplatte wurden die Fraktionen einer Sep-Pak-Trennung von TFA 0,1% im Zellversuch eingesetzt und eine GH-Messung vorgenommen.

Abbildung 14



Die Sep-Pak-Fractionen wurden als Duplikate, die Positivkontrolle mit Adenosin und die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12 als 8fach-Bestimmung im Zellversuch eingesetzt.

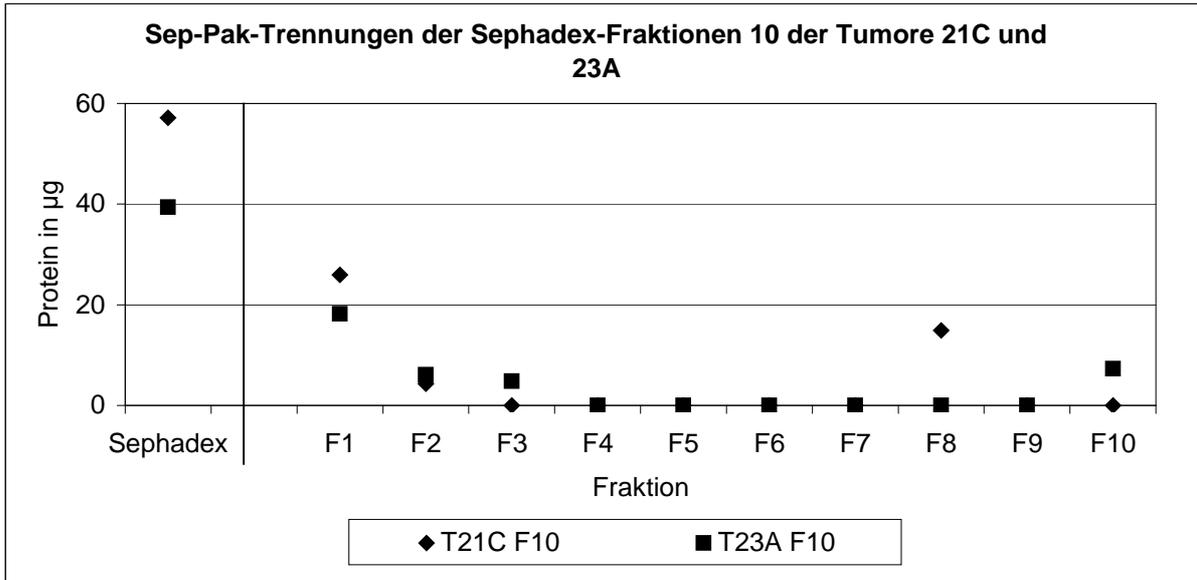
Die Sep-Pak-Fractionen zeigen keine Hemmung der GH-Sekretion im Zellversuch, die Messwerte bewegen sich im Bereich der Negativkontrolle plus/ minus zwei Standardabweichungen. Die internen Positivkontrollen im Zellversuch weisen keine gesteigerte GH-Sezernierung (keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle, $p > 0,1$) auf, so dass eine Stimulation der GH-Sekretion aus methodischen Gründen nicht ausgeschlossen oder nachgewiesen werden kann.

4.4.2. Sephadex-Fractionen

4.4.2.1. Tumor 21C, Sephadex-Fraktion 10 und Tumor 23A Sephadex-Fraktion 10

Die Sephadex-Fractionen 10 der Tumore 21C (T21CF10) und 23A (T23AF10), die in vorangegangenen Versuchen im Zellversuch keine Stimulation gezeigt hatten, wurden getrennt und die Proteinverteilung im Bradford-Assay bestimmt.

Abbildung 15: Proteinmessung



Mittelwerte aus 3 Einzelmessungen jeder Fraktion erstellt.

Im Rahmen der Sep-Pak-Trennungen der beiden Sephadex-Fraktionen zeigten sich sowohl die Fraktionen 1 für beide Tumoren als auch die Fraktion 8 für T21CF10 positiv für Protein. Somit kann für die Sephadex-Fraktion T21CF10 angenommen werden, dass es sich um ein Gemisch verschiedener Proteine handelt.

Da sich die Sephadex-Fraktionen im vorherigen Zellversuch bereits als nicht bioaktiv erwiesen hatten, erfolgte mit den Sep-Pak-Fraktionen kein Zellansatz.

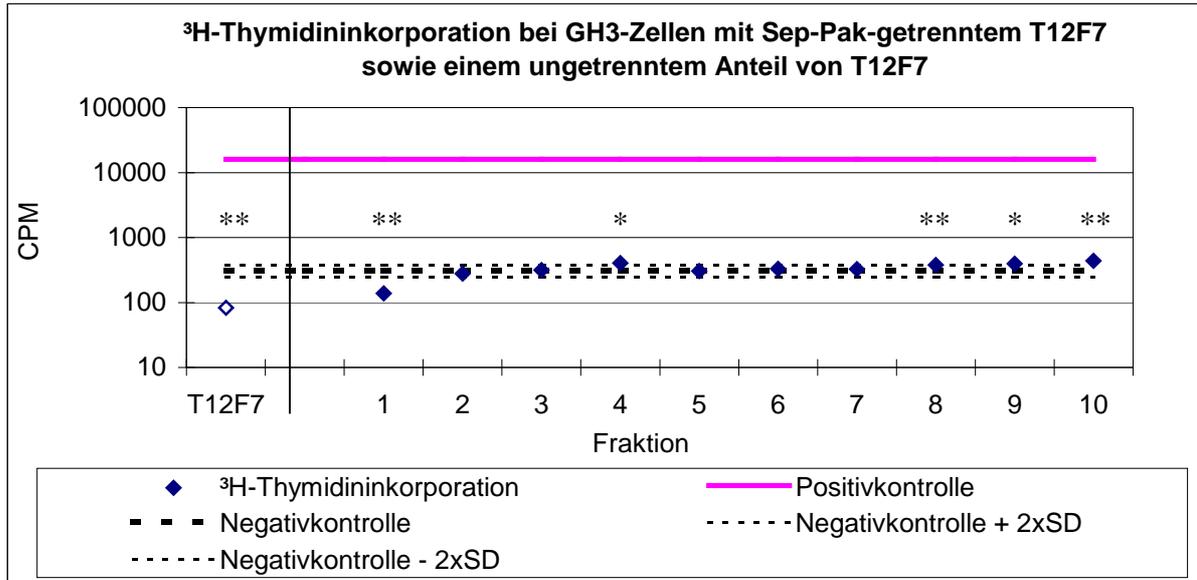
4.4.2.2. Tumor 12, Sephadex-Fraktionen 7, 9 und 10

Es erfolgten Sep-Pak-Trennungen der Sephadex-Fraktionen 7, 9 und 10 des Tumors 12 (T12F7, T12F9 und T12F10). Für diese Fraktionen war es im ersten Zellversuch zu einer Stimulierung der Proliferation (Anstieg der ^3H -Thymidininkorporation) gekommen.

Mittels Bradford-Assay liessen sich in keiner der drei Sep-Pak-Trennungen proteinpositive Fraktionen nachweisen. Die Messwerte für die getrennten Sephadex-Fraktionen sind ebenfalls negativ.

Es erfolgte die Verwendung der Sep-Pak-Fraktionen der Sephadex-Fraktionen 7, 9 und 10 des Tumors 12 im Zellansatz mit Bestimmung der ^3H -Thymidininkorporation.

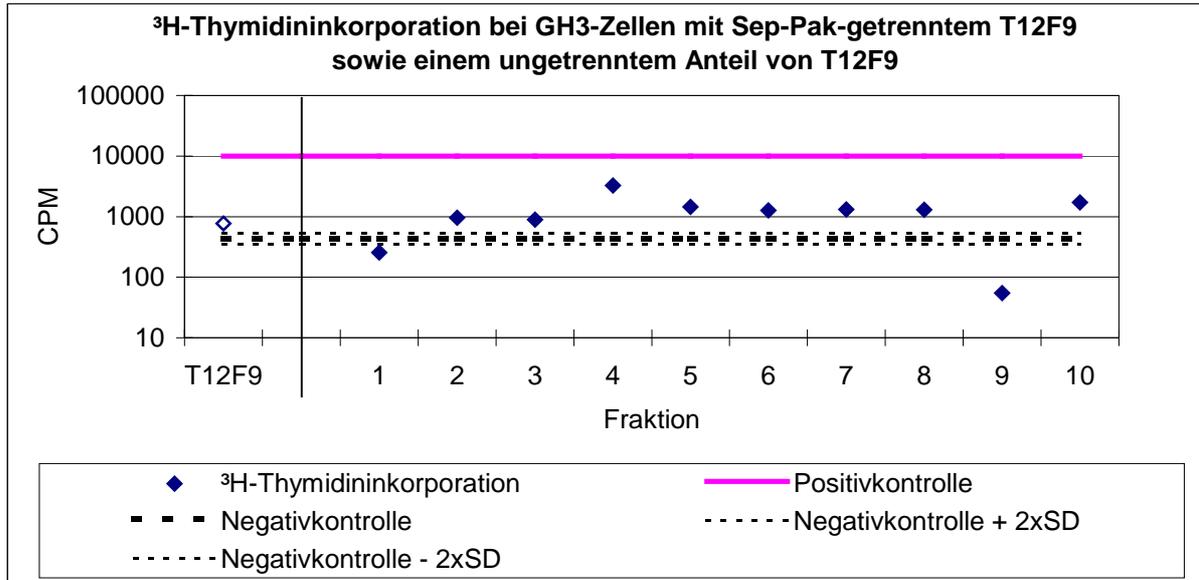
Abbildung 16



* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Sep-Pak-Fractionen wurden als 3fach-Werte, die Positivkontrolle mit Adenosin und die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12 als 12fach-Bestimmung im Zellversuch eingesetzt.

Die ^3H -Thymidinmessung weist schwach positive, aber signifikante ^3H -Thymidininkorporationen nach Inkubation mit den Sep-Pak-Fractionen 4, 8, 9 und 10 nach, allerdings zeigt die mitgetestete Sephadex-Fraktion im neuerlichen Bio-Assay keine positiven Ergebnisse bezüglich der ^3H -Thymidininkorporation. Es finden sich eine deutliche Hemmung durch die Sephadex-Fraktion und die Sep-Pak-Fraktion 1. Quantitativ unterscheiden sich die positiven Fractionen (MW/ SD: F4 407/ 75, F8 380/ 23, F9 395/ 50, F 10 436/ 57) geringer von den Negativkontrollen (MW/ SD 308/ 30), es findet sich ein deutlicherer Unterschied bzgl. Sephadex-Fraktion T12F7 und der Sep-Pak-Fraktion 1 (MW/ SD: Sephadex 83/ 7, F1 138/ 28) im Vergleich zu den Negativkontrollen. Diese Daten sprechen im aktuellen Versuchsansatz für eine Hemmung durch die Sephadex-Fraktion T12F7 und die zugehörige Sep-Pak-Fraktion 1.

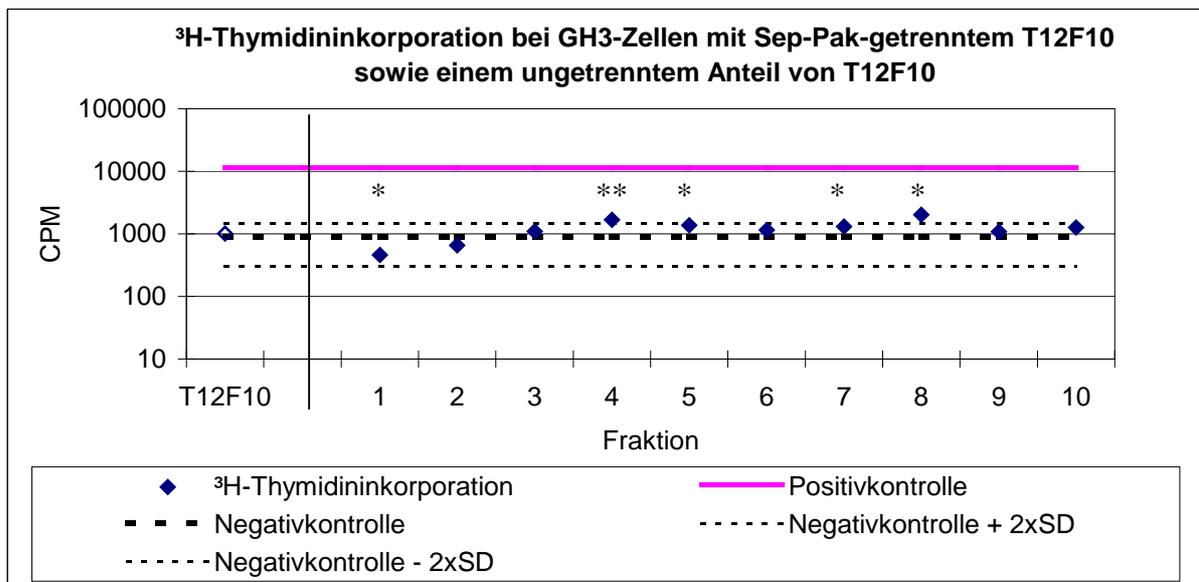
Abbildung 17



Für alle Sep-Pak-Fractionen und Sephadexfraktion von T12F9 ist jeweils $p < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Sep-Pak-Fractionen wurden als 3fach-Werte, die Positivkontrolle mit Adenosin als 12fach- und die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12 als 18fach-Bestimmung im Zellversuch eingesetzt.

Von der Sephadex-Fraktion 9 des Tumors 12 sind die Sep-Pak-Fractionen 2-8 und 10 positiv, in den Fractionen 1 und 9 zeigt sich eine Hemmung. Ein Aliquot der Sephadex-Fraktion T12F9 ist ebenfalls im gleichen Zellansatz als Kontrolle positiv. Die weite Verteilung der Stimulation entspricht allerdings nicht der zu erwartenden Konzentration eines stimulierenden Faktors in einer Sep-Pak-Fraktion.

Abbildung 18



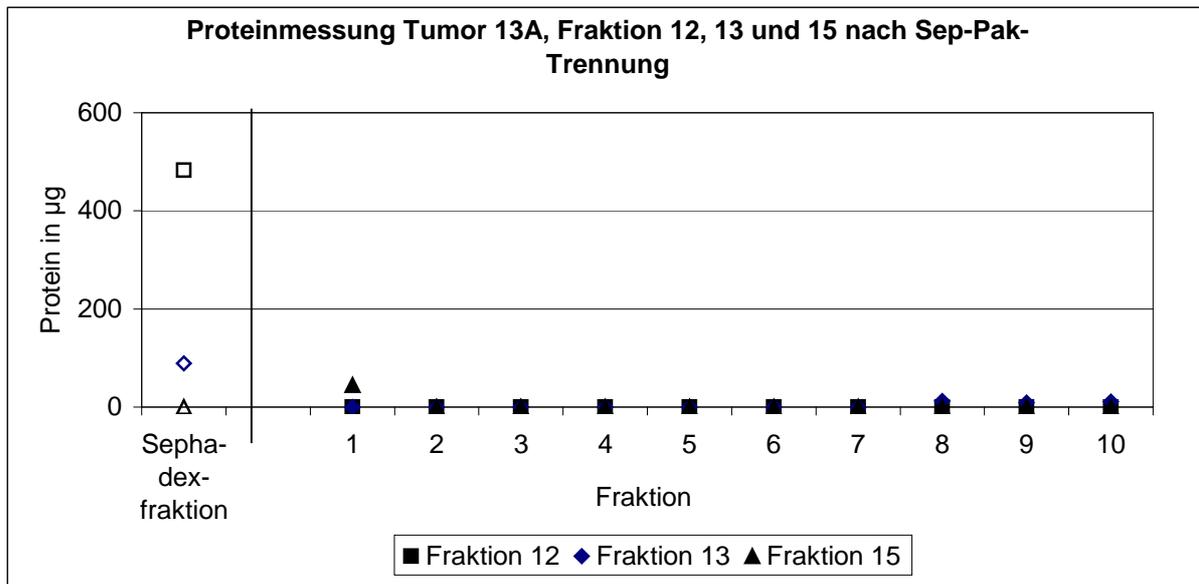
* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Sep-Pak-Fractionen wurden als 3fach-Werte, die Positivkontrolle mit Adenosin als 8fach- und die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12 als 15fach-Bestimmung im Zellversuch eingesetzt. Die Fraktion 2 wurde am Ende des Zellversuchs als optisch kontaminiert gewertet, die mit Fraktion 8 inkubierten GH3-Zellen waren avital.

Ähnlich wie bei Sephadex-Fraktion 7 lassen sich für die Sephadex-Fraktion 10 positive, aber auch in Fraktion 1 einmalig negative ^3H -Thymininkorporationen nach Sep-Pak-Trennung zeigen, aber auch hier kann das positive Messergebnis der Fraktion 10 des Tumors 12 nicht bestätigt werden.

4.4.2.3. Tumor 13, Sephadex-Fraktionen 12, 13 und 15

Es erfolgten Sep-Pak-Trennungen der Sephadex-Fraktionen 12, 13 und 15 des Tumors 13 (T13F12, T13F13, T13F15).

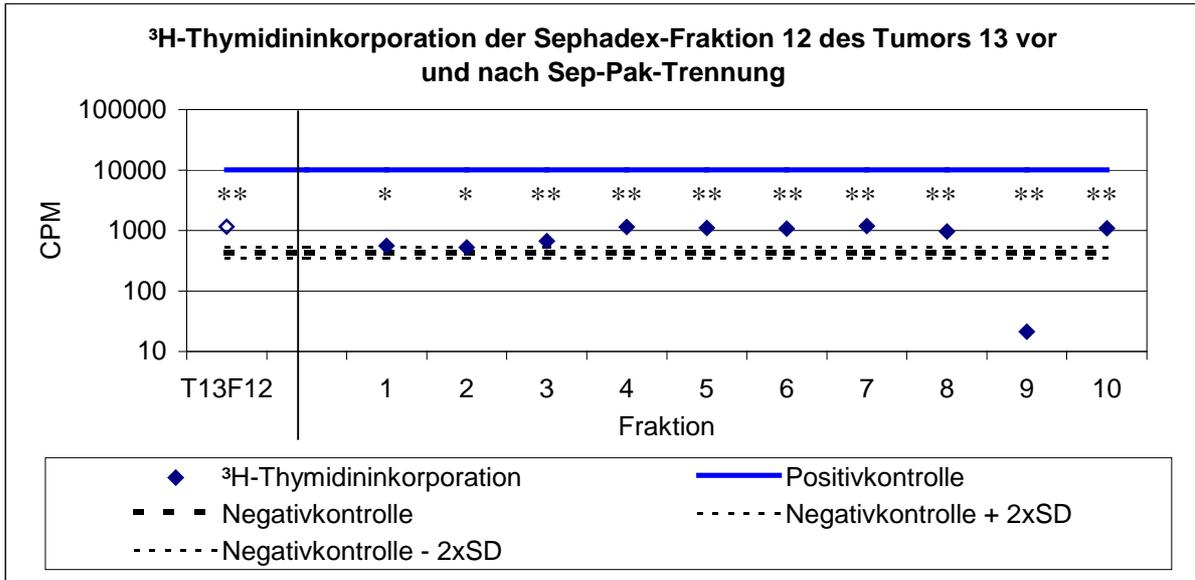
Abbildung 19



In den Sephadex-Fraktionen 12 und 13 des Tumors 13A ist Protein nachweisbar. In den Sep-Pak-Fraktionen dieser Sephadex-Fraktionen findet sich kein Protein, ebenso wie in der Sephadex-Fraktion 15 und den entsprechenden Sep-Pak-Fraktionen.

Die Sephadexfraktionen 12 und 13 wurden zur Bestimmung der Zellproliferation eingesetzt, die Fraktion 15 zur Prüfung der Wachstumshormonausschüttung.

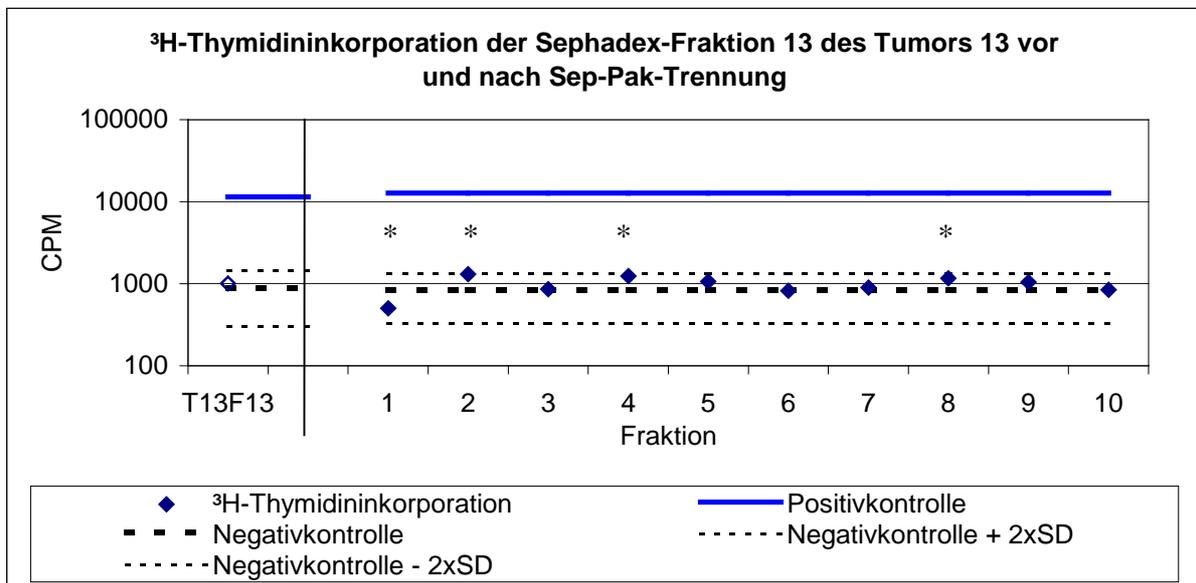
Abbildung 20



* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Sep-Pak-Fraktionen wurden als 3fach-Werte, die Positivkontrolle mit Adenosin als 12fach- und die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12 als 18fach-Bestimmung im Zellversuch eingesetzt.

Es zeigen sich positive ^3H -Thymidininkorporationen in den Fraktionen 1-8 und 10 sowie in der Sephadex-Fraktion 12 des Tumors 13. Noch auffälliger jedoch ist die totale Supprimierung der Zellproliferation in der Fraktion 9.

Abbildung 21:

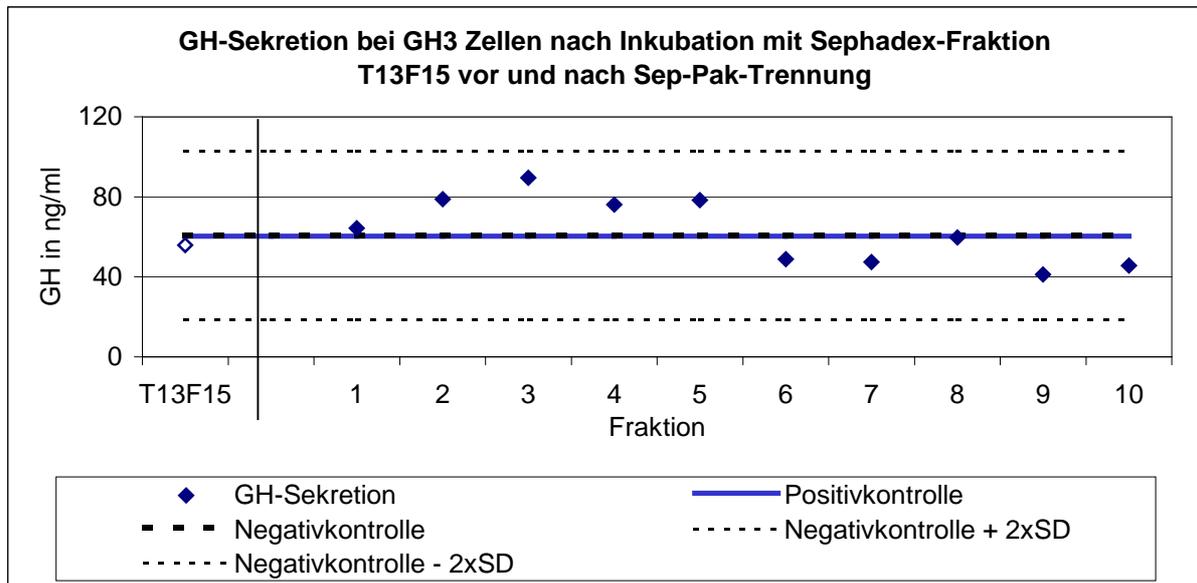


* $p < 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Sep-Pak-Fraktionen wurden als 3fach-Werte, die Positivkontrolle mit Adenosin als 12fach- und die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12 als 15fach-Bestimmung im Zellversuch eingesetzt. Unterschiedliche Werte für Positiv- und Negativkontrollen zwischen Sephadex- und Sep-Pak-Fraktionen beruhen auf dem Ansatz auf 2 verschiedenen Multititerplatten.

Es finden sich bzgl. der ^3H -Thymidininkorporation die positiven Sep-Pak-Fraktionen 2, 4 und 8 nach Trennung der Sephadex-Fraktion 13. Unter dem Ansatz mit Fraktion 1 zeigt sich eine

Hemmung der Zellproliferation. Die Stimulation der Zellen durch die Sephadex-Fraktion 13 bestätigt sich in der Kontrolle nicht.

Abbildung 22



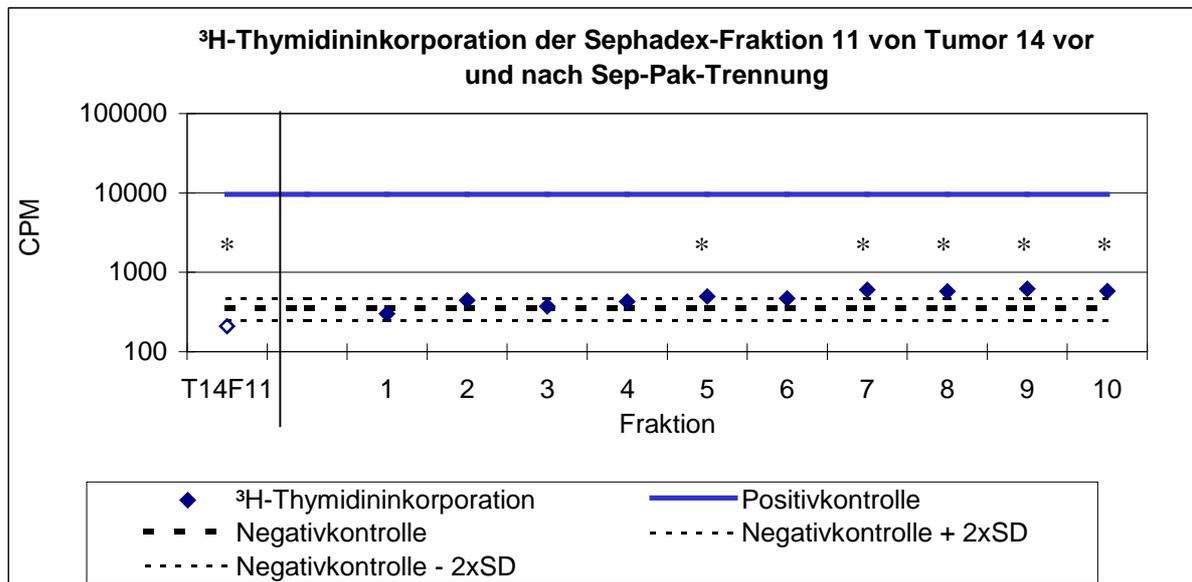
Die Sep-Pak-Fractionen wurden als 2fach-Werte, die Positivkontrolle mit Adenosin und die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12 als 8fach-Bestimmung im Zellversuch eingesetzt.

Nach Inkubation der GH3-Zellen lässt sich weder für die ungetrennte Sephadex-Fraktion 15 noch ihre Sep-Pak-Fractionen eine Stimulation der Wachstumshormonsekretion nachweisen, die Messwerte liegen im Schwankungsbereich der Negativkontrolle. Jedoch zeigen in diesem Zellversuch die als Positivkontrolle Adenosin-stimulierten GH3-Zellen ebenfalls keine signifikante GH-Sekretion ($p > 0,1$).

4.4.2.4. Tumor 14, Sephadex-Fraktion 11

Es erfolgte die Sep-Pak-Trennung der Sephadex-Fraktion 11 von Tumor 14. Die Proteinmessungen der Sephadex- und der Sep-Pak-Fraktionen waren negativ.

Abbildung 23:



* $p < 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Sep-Pak-Fraktionen wurden als 3fach-Werte, die Positivkontrolle mit Adenosin und die Negativkontrolle mit SF-DM/ F12 als 12fach-Bestimmung im Zellversuch eingesetzt.

Die Sephadex-Fraktion 11 von Tumor 14 zeigt eine schwache Hemmung, die zugehörigen Sep-Pak-Fraktionen 5, 7, 8, 9, 10 zeigen im Zellversuch eine schwache Stimulierung der ³H-Thymidininkorporation.

5. Diskussion

5.1. Bradford-Assay

Als wesentliche Limitierung des Bradford-Assays ist seine Interferenz mit Detergenzien beschrieben (26; 27). In niedriger Konzentration können Detergenzien die Sensitivität des Assays verbessern. Bei Überschreiten einer für die meisten Substanzen nur geringen Maximalkonzentrationen drohen Störungen der Proteinmessung. Bei Acetonitril beträgt der empfohlene Maximalwert 10% (28; 29), welcher durch die eingesetzten Waschpuffer deutlich überschritten wird. Als Ursache wird das Entstehen nicht-ionischer Bindungen zwischen den Detergenzien und dem Protein diskutiert (27). Somit ist die direkte Messung der Proteinkonzentrationen nicht möglich.

Mehrere alternative Verfahren zur Proteinmessung stehen zur Verfügung.

Eine Möglichkeit stellt die UV-Absorption als semiquantitatives Verfahren (30) dar. Nachteile sind jedoch Störungen der Absorption durch Probenverunreinigung mit Puffern, Salzen und anderen Beimischungen. Weiterhin hängt die Absorption unmittelbar von der Zusammensetzung des Proteins ab, so dass quantitative Aussagen nur bei Verwendung eines identischen Standards möglich sind und ansonsten die Konzentration nur näherungsweise berechnet werden kann nach $[\text{Protein}] \text{ (mg/ml)} = 1.55 \cdot A_{280} - 0.76 \cdot A_{260}$. Abweichungen ergeben sich in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke der Lösung. Aufgrund des unterschiedlichen Gehaltes an Acetonitril in den Proben ist eine UV-Absorptionsbestimmungen ohne zusätzlichen Reinigungsschritt nicht möglich.

Der Lowry-Assay (31; 32) und insbesondere nachfolgende Weiterentwicklungen (33; 34) erlauben auch einen Einsatz des Assays bei Verunreinigung der Proben durch Detergenzien. Nachteilig ist der hohe Zeitaufwand für die Durchführung des Assays sowie die mangelnde Haltbarkeit der fertigen Assay-Reagenz.

Der BCA-Assay (bicinchoninic acid-assay) oder Smith-Assay (35; 36) stellt eine mögliche Alternative bei Verunreinigung der Proben mit Lösungsmitteln dar, es bestehen nur geringe Interferenzen mit Puffern. Die aufgrund des engen Messbereiches erforderlichen niedrigen Probenkonzentration bedingen häufig zusätzliche Verdünnungsschritte, falls die Proben zu hohe Konzentrationen aufweisen.

Als alternative Vorgehensweise bei gewünschtem Festhalten am Bradford-Assay oder auch ursprünglichen Lowry-Assay ist eine Probenreinigung durch Proteinausfällung beschrieben (37, 38; 39). Proteinausfällungen können jedoch je nach Durchführung und Reagenz mit

Proteinverlusten einhergehen, weiterhin sind Probleme beim Auflösen des Pellets beschrieben und es findet ein zusätzlicher Chemikalienverbrauch statt (40).

Im direkten Vergleich von Bradford-, Lowry- und BCA-Assay zeigte sich eine geringere Beeinflussung des Bradford-Assay durch Verunreinigungen. Weiterhin waren nach Proteinfällung mit Trichloressigsäure im Lowry- und BCA-Assay geringere Proteinkonzentrationen als in der Ausgangslösung nachweisbar, was im Bradford-Assay nicht auftrat (41).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass statt einer klassischen Proteinausfällung die einfacher durchzuführende Vakuumzentrifugation gut praktikabel für die Entfernung des Acetonitril ist. Diese kann auch bei verschiedenen Konzentration des Lösungsmittels vorgenommen werden und erlaubt die sichere Bestimmung der Proteinmenge im Bradford-Assay. Für Acetonitrilkonzentrationen > 60% bestehen Einschränkungen der Messbarkeit von Albumin. Insulin und Cytochrom C sind auch in Lösungen von 80% Acetonitril nach entsprechender Aufbereitung messbar.

5.2. Sep-Pak-Trennung

Zahlreiche unterschiedliche Verfahren zur selektiven Reinigung von Proteingemischen sind beschrieben. Zu den frühesten und ungenauesten Verfahren zählen die Proteinfällungsreaktionen mit steigenden Salz- oder Lösungsmittelkonzentrationen oder im Hitzeverfahren, basierend auf den Veränderungen der Löslichkeit bzw. der Proteinstruktur (42; 43).

Die Adsorption, z.B. im Rahmen einer Säulenchromatographie, erzielt ebenso wie eine Gelfiltration oder Größenausschluss-Chromatographie eine hohe Effektivität und Trennschärfe, ist jedoch z.B. bei der Größenausschluss-Chromatographie auf maximal 10 Proteine im Gemisch begrenzt. Im analytischen Bereich erfolgt der Einsatz der Gelelektrophorese, wobei die Proteine für eine weitere Verwendung anschließend aus der Gelphase extrahiert werden müssen (42; 43).

Bei der Sep-Pak-Trennung handelt es sich um eine Festphasenchromatographie mit hoher Ausbeute unter Nutzung hydrophober Eigenschaften, mit der selektiv Protein mit geeigneten Lösungsmitteln aus z.B. Gewebehomogenisaten gewonnen werden kann (44). In den meisten Anwendungen werden die Proben nur mit einer Konzentration eines Waschpuffers, meist Acetonitril in Konzentrationen zwischen 50 und 80% in TFA 0,1%, gewonnen (45; 46). Eine Fraktionierung mit verschiedenen Konzentrationen erfolgt nicht, jedoch legen die Ergebnisse in dieser Arbeit am Beispiel von Albumin, Insulin, Cytochrom C und Prolaktin nahe, dass bei Einsatz ansteigender Acetonitrilkonzentrationen eine Auftrennung möglich ist. Die Versuche

zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit und Konstanz für proteinpositive Fraktionen bei Einsatz der drei genannten Proteine. Sättigen führt nicht zur Reduktion von irreversiblen Bindungen des eingesetzten Proteines an die Matrix und verbessert nicht die Ausbeute.

Insgesamt können durch den Einsatz der Sep-Pak-Trennung sowohl bei nachfolgender Säulenchromatographie als auch im Zellversuch klarere Ergebnisse erwartet werden.

5.3. Zellversuche

Die Zellversuche zeigen, dass durch eine Sep-Pak-Trennung gewonnene Fraktionen im Zellversuch einsetzbar sind. Systemische Effekte durch die eingesetzten Chemikalien, z.B. durch unterschiedliche Acetonitrilkonzentrationen, liessen sich nicht nachweisen.

Die durchgeführten Trennungen von Sephadex-Fractionen von operativ gewonnenen Hypophysenadenompräparaten zeichneten sich durch eine schlechte Reproduzierbarkeit der Stimulation von z.B. Zellproliferation im wiederholten Bio-Assay aus. Es konnte in der Sep-Pak-Trennung von T12F7 ein konkordantes Verhalten sowohl bei Einsatz eines Aliquots der Sephadex-Fraktion als auch ihrer Sep-Pak-Fractionen (Hemmung der Proliferation durch die Sephadexfraktion und die Sep-Pak-Fraktion 1) gezeigt werden.

Limitiert ist die Aussage der Zellversuche bzgl. der Stimulation der Sekretion von Wachstumshormon durch den schlechten Ausfall der Positivkontrollen in der Wachstumshormonssekretion.

Nicht methodisch zu erklären ist die breite Verteilung stimulierender Effekte durch verschiedene Sep-Pak-Fractionen bei verschiedenen Tumorfraktionen. Nach den Ergebnissen der Proteinstandards ist bei den bereits mittels Säulenchromatographie aufgereinigten Proben eine Konzentration des stimulierenden Faktors in einer Sep-Pak-Fraktion zu erwarten. Eine mögliche Erklärung ist in einem Teil der Versuche die geringe Standardabweichung der Negativkontrollen, die räumlich jeweils in einem engen Bereich der Multititerplatte angeordnet sind. Durch die geringe Standardabweichung steigt die Sensitivität des Zellversuches, das Auftreten falsch-positiver Ergebnisse wird begünstigt.

Auch wenn die p-Werte für positive Fraktionen signifikant sind, finden sich nur geringe quantitative Unterschiede zu den nominellen Werten der Negativkontrolle. Aus Gründen der Versuchswirtschaftlichkeit konnten Fraktionen im Zellversuch nur simultan und in maximal Dreifachbestimmung eingesetzt werden. Dadurch ist trotz Einsatzes angepasster statistischer Verfahren die Aussage der Berechnungen limitiert.

Für eine genauere Einschätzung der beschriebenen Effekte wären weitere Zellversuche mit stimulierenden Sephadex- und den dazugehörigen Sep-Pak-Fractionen in größeren Stichproben klärend.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Fraktionierung von Proteingemischen mittels ansteigender Acetonitrilkonzentrationen durch Trennung auf einer Sep-Pak-Kartusche möglich ist und die so gewonnenen Fraktionen ohne negative Effekte im Zellversuch eingesetzt werden können.

Für weitere Versuche können dadurch nach Sep-Pak-Trennung stimulierende oder inhibierende Bestandteile aus Homogenisaten von Hypophysenadenomen nach einem ersten Reinigungsschritt im Zellversuch aufgefunden und mittels nachfolgender Säulenchromatographie weiter isoliert werden.

Für die Proteinmessungen durch den Bradford-Assay konnte nachgewiesen werden, dass die Entfernung des Lösungsmittels durch Vakuumzentrifugation aufwändigere Schritte ersetzen kann, ohne dass Interferenzen im Assay oder ein Verlust an Probenmaterial eintreten.

7. Literatur

- 1 Lippert H: Lehrbuch der Anatomie. 3. erw. Auflage, Urban und Schwarzenberg 1993: 499-501
- 2 Linß W, Halbhuber KJ: Histologische und mikroskopische Anatomie. 17.Auflage, Georg Thieme, Leipzig, 1991
- 3 Scherbaum WA, Drynda K, Fehm HL: Thiemes Innere Medizin: TIM, Stuttgart, New York, Thieme, 1999: 146-147
- 4 Beckers A, Stevenaert A: Pituitary adenomas. An interactive resource for your library. CD Rom. Graph Med Ltd., 2001
- 5 Molitch ME, Russell EJ: The pituitary "incidentaloma". *Ann Intern Med (United States)* 112 (12), 1990: 925-931
- 6 Asa SL, Ezzat S: The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocrine Reviews* 19: 1998: 798-827
- 7 Renner U, Pagotto U, Arzt E, Stalla GK: Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitaryfunction and growth: a review. *European journal of Endocrinology* 135, 1996: 515-532
- 8 Riede UN, Saeger W: Adenohypophyse: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, 1999: 968-971
- 9 Hentges S, Sarkar DK: Transforming growth factor- β -regulation of estradiol-induced prolaktinomas. *Frontiers of Neuroendocrinology* 22, 2001:340-363
- 10 Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, et al: Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 19, 1997: 103-113
- 11 Saiardi A, Bozzi Y, Baik J, Borrelli E: Antiproliferative role of dopamine: Loss of D2-receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* 19, 1979: 115-126
- 12 Farrel WE, Clayton RN: Epigenetic change in pituitary tumorigenesis. *Endocrine Related Cancer* 10, 2003: 323-330
- 13 Osamura RY, Egashira N, Miyai S, et al: Molecular pathology of the pituitary. *George Kontogeorgos, Kalman Kavacs: Molecular pathology of the pituitary* 32, 2004: 20-33
- 14 Simpson DJ, Frost SJ, Bicknell JE, et al: Aberrant expression of G(1)/S regulators is a frequent event in sporadic pituitary adenomas. *Carcinogenesis* 22, 2001: 1149-1154
- 15 Simpson DJ, Fryer AA, Grossman AB, et al: Cyclin D1 (CCND1) genotype is

- associated with tumour grade in sporadic pituitary adenomas. *Carcinogenesis* 22, 2001: 1801-1807
- 16 Buchfelder M: Hypophysenadenome. *Der Onkologe* 5, 1999: 94-102
- 17 Clayton RN, Farrell WE: Pituitary tumour clonality revisited. George Kontogeorgos, Kalman Kavacs: *Molecular pathology of the pituitary* 32, 2004: 186-204
- 18 Clayton RN, Pfeifer M, Atkinson AB, et al: Clonality of pituitary tumours: more complicated than initially envisaged. *Brain Pathology* 11, 2001: 313-327
- 19 Löffler G: Replikation und Gentechnik, in Löffler/ Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie* 6. Auflage: 229-231, 1998
- 20 Muşat M, Vax VV, Borboli N, et al: Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis. *Molecular Pathology of the Pituitary* 32, 2004: 34-62
- 21 Lidhar K, Korbonits M, Jordan S, et al: Low expression of cell cycle inhibitor p27^{Kip1} normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84, 1996: 3823-3830
- 22 Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchell R, Gospodarowicz D: Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy Science of the U.S.A.* 84, 1987: 5773-5777
- 23 Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161, 1989: 851-858
- 24 Sarkar O: Expression und Funktion der TGF- β -Isoformen in Hypophysentumorzellen Dissertation an der MU München 2007
- 25 Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89, 1963: 114-123
- 26 Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye ligand binding. *Anal Biochem* 72, 1976: 248-254.
- 27 Friedenauer S, Berlet HH: Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal Biochem* 1989 May 1; 178 (2): 263-268
- 28 anon.: BIO-RAD, Quick Start™ Bradford Protein Assay. (Accessed May 11, 2007, at <http://www.bio-rad.com>)
- 29 Fanger BO: Adaption of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Anal Biochem* 1987 Apr; 162(1): 11-17

- 30 Layne E: Ultraviolet absorbance of aromatic amino acids methods. *Enzymology* 3, 1957: 447-455
- 31 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 1951: 265
- 32 Hartree EE: Determination of protein; A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48, 1972: 422-427
- 33 Dulley JR, Grieve PA: A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal Biochem* 64, 1975: 136-141
- 34 Bensadoun A, Weinstein D: Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* 1976 Jan; 70(1): 241-250
- 35 Smith PK et al.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 1985: 76-85
- 36 Wiechelmann KJ, Braun RB, Fitzpatrick JD: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175, 1988: 231-237.
- 37 Peterson GL et al: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 1977: 346-356
- 38 Compton SJ, Jones CG: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151, 1985: 369-375
- 39 Gupta R, Bradoo S, Saxena RK: Rapid purification of extracellular tannase using polyethylene glycol-tannic acid complex letters. *Applied Microbiology* 24 (4), 1997: 253-255
- 40 Campbell J: Protocols protein precipitation procedures. BMSL UWO Biological Mass Spectrometry Laboratory. (Accessed June 6, 2007, at http://www.biochem.uwo.ca/wits/bmsl/protein_precipitation_procedures.html)
- 41 Berges J, Fisher A, Harrison P: A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *thalassiosira pseudonana*. *Marine Biology* Vol 115/2, 1993: 187-193
- 42 Scopes RK: Protein purification 3th edition, Springer Verlag New York 1994
- 43 Murray P: Methods in Enzymology Vol.182 Academic Press San Diego 1990
- 44 Pati D, Habibi H: Presence of salmon GnRH and compounds with GnRH-like activity in the ovary of goldfish. *Endocrinology* 139, 1998: 2015-2024
- 45 Tilemnas D et al: In vitro evidence that an 11-kilodalton N-terminal fragment of

- proopiomelanocortin is a growth factor specifically stimulating the development of lactotrophs in rat pituitary during postnatal life. *Endocrinology* 135/1 1994: 168-174
- 46 Vriese C et al: Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology* 148, No. 5, 2006: 2355-2362

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-J. Quabbe und Frau PD Dr. U. Plöckinger, die mir die Gelegenheit gaben, in ihrer Arbeitsgruppe mit ihrer kritischen Unterstützung dieses Thema zu untersuchen. Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-J. Quabbe für seine wertvollen Hinweise und die rasche Korrektur meiner Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. A. Drost, welche mich in die Grundlagen der Laborarbeit einführte und bei praktischen Problemen eine jederzeit hilfsbereite, kompetente Ratgeberin war und die Zellversuche durchführte.

Weiterhin danken möchte ich meinen Kommilitonen Manuela Jaenicke und Matthias Binder, die mit ihren eigenen Arbeiten die Grundlagen und Ausgangsbasis für meine Arbeit schufen.

Eine wertvolle Unterstützung im Laboralltag war Marina Rochel mit ihrer Erfahrung, Umsicht und Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie und meinen Eltern möchte ich danken für das Verständnis, die Unterstützung und die Geduld, die sie mir gegenüber aufbrachten.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Datum

Unterschrift

Erklärung

„Ich, Hartmut Linde, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Wachstumsfaktoren in Extrakten humaner Hypophysenadenome: Untersuchung von Fraktionierung mittels Festphasenchromatographie und Auswirkungen auf Stimulation und Hemmung der Proliferation von GH3-Zellen, gemessen an ³H-Thymidininkorporation und Hormonsekretion“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift